

Doktori (PhD) értekezés

**Genetikai transzformációt lehetővé tevő szövettenyésztési
rendszerek kialakítása kabakos növényeknél**

Írta:

Kissné Bába Erzsébet

Témavezető:

Dr. Bisztray György Dénes



GENETIKA ÉS NÖVÉNYNEMESÍTÉS TANSZÉK

Budapest

2009

A doktori iskola

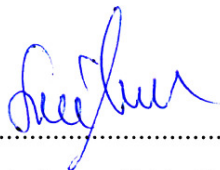
megnevezése: Kertészettudományi Doktori Iskola

tudományága: Növénytermesztési és kertészeti tudományok

vezetője: Dr. Tóth Magdolna
egyetemi tanár, DSc
Budapesti Corvinus Egyetem, Kertészettudományi Kar,
Gyümölcstermő Növények Tanszék

Témavezető: Dr. Bisztray György Dénes
egyetemi docens, PhD
Budapesti Corvinus Egyetem, Kertészettudományi Kar,
Szőlészeti Tanszék

A jelölt a Budapesti Corvinus Egyetem Doktori Szabályzatában előírt valamennyi feltételnek eleget tett, az értekezés műhelyvitájában elhangzott észrevételeket és javaslatokat az értekezés átdolgozásakor figyelembe vette, azért az értekezés védési eljárásra bocsátható.



.....
Az iskolavezető jóváhagyása



.....
A témavezető jóváhagyása

**A Budapesti Corvinus Egyetem Élettudományi Területi Doktori Tanácsának
2009. október 6-i határozatában a nyilvános vita lefolytatására az alábbi bíráló
bizottságot jelölte ki:**

BÍRÁLÓ BIZOTTSÁG:

Elnöke:	Terbe István, DSc Budapesti Corvinus Egyetem
Tagjai:	Füstös Zsuzsanna, CSc Mezőgazdasági Szakigazgatási Hivatal Gémesné Juhász Anikó, PhD MTA Mezőgazdasági Kutatóintézet Kiss Erzsébet, CSc Szent István Egyetem
Opponensek	Mészáros Annamária, PhD MTA Mezőgazdasági Kutatóintézet Dobránszky Judit, CSc Debreceni Egyetem
Titkár	Halász Krisztián, PhD Budapesti Corvinus Egyetem

TARTALOMJEGYZÉK

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	7
2. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK.....	8
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	13
3.1. A sárgadinnye jellemzése és jelentősége.....	13
3.2. A tökfajok jellemzése és jelentősége	14
3.3. A növényregenerációs módszerek.....	15
3.3.1. Organogenezis.....	15
3.3.2. Szomatikus embriogenezis.....	16
3.4. A sárgadinnye regeneráció módszerei.....	16
3.5. A tökfélék regenerációjának módszerei	21
3.6. Génbeviteli eljárások	24
3.7. <i>Agrobacterium</i> közvetítette növénytranszformáció	26
3.8. A sárgadinnye transzformáció módszerei.....	27
3.9. A tökfélék transzformációs módszerei	30
4. ANYAG ÉS MÓDSZER	32
4.1. Felhasznált anyagok	32
4.1.1. Növények	32
4.1.1.1. Sárgadinnye fajták	32
4.1.1.2. Tök fajták	33
4.1.2. Növényi táptalajok, növekedésszabályozó anyagok	34
4.1.2.1. Szilárd táptalajok és növekedésszabályozó anyag összetételük sárgadinnye esetében.....	34
4.1.2.2. Folyékony táptalajok és növekedésszabályozó anyag összetételük sárgadinnye esetében.....	35
4.1.2.3. Szilárd táptalajok tökfélék esetében	36
4.1.3. Felhasznált baktériumtörzsek és plazmidok.....	37
4.2. Alkalmazott módszerek.....	39
4.2.1. Fertőtlenítési módszerek	39
4.2.2. Sárgadinnye regeneráció szilárd táptalajról indítva	40
4.2.2.1. Magvetés és nevelési körülmények	40
4.2.2.2. Sárgadinnye fajták válaszadó képességének vizsgálata különböző táptalajokon	40
4.2.2.3. Tenyésztetek indítása különböző növényi részek felhasználásával	41
4.2.2.4. Növekedésszabályozó anyagok optimalizációja.....	42
4.2.2.5. Agar és phytigel bázisú szilárd táptalajok összehasonlítása	42
4.2.2.6. Regeneráns sárgadinnye növények gyökereztetése és akklimatizálása	43
4.2.3. A sárgadinnye regeneráció folyékony táptalajról indítva.....	44
4.2.3.1. Tenyésztési körülmények	44
4.2.3.2. Előkísérlet a magyar sárgadinnye fajták válaszadó képességének tesztelésére	44
4.2.3.3. Növekedésszabályozó anyagok optimalizációja.....	44
4.2.3.4. A magok életkorának hatása a regenerációra	44
4.2.4. A tök fajták regenerációja	45
4.2.5. A baktériumtörzsek tárolási és tenyésztési körülményei.....	45
4.2.6. Antibiotikum érzékenység tesztelése	46
4.2.7. A sárgadinnye transzformáció körülményei.....	46
4.2.8. Agar és phytigel tartalmú táptalajok hatása a szelektív táptalajon felnevelt növények regenerációjának hatékonyságára.....	48
4.2.9. Tök transzformáció	49
4.2.10. DNS kivonás tök és sárgadinnye növényekből	50
4.2.11. A DNS beépülésének ellenőrzése PCR (Polymerase Chain Reaction) technikával	50

4.2.12.	Mikroszkópos vizsgálatok.....	51
4.2.13.	Statisztikai számítások	51
5.	EREDMÉNYEK.....	53
5.1.	A magvak fertőtlenítése.....	53
5.2.	Regenerációs kísérletek eredményei.....	55
5.2.1.	A sárgadinnye fajták válaszdó képességének tesztelése szilárd táptalajon	55
5.2.2.	Az indításra használt növényi részek befolyása a regenerációs képességre szilárd táptalajon	57
5.2.3.	Szilárd táptalajok növekedésszabályozó anyag összetételének hatása sárgadinnye regenerációjára.....	61
5.2.4.	Az agar ill. a phytigel tartalmú szilárd táptalajok hatásának összehasonlítása a regenerációs hatékonyság növelése érdekében	64
5.2.5.	A sárgadinnye fajták válaszdó képességének tesztelése folyékony táptalajon.....	64
5.2.6.	Folyékony táptalajok növekedésszabályozó anyag összetételének hatása a sárgadinnye regenerációjára	65
5.2.7.	A magok életkorának hatása a regenerációra	69
5.2.8.	A folyékony táptalaj összetevőinek hatása az embriogenezisre	70
5.2.9.	A regenerációs kísérletek eredményei szilárd táptalajon tökfélék esetében.....	73
5.2.10.	Növekedésszabályozó anyag optimalizációs kísérletek szilárd táptalajon, három tökféle esetében	74
5.2.11.	A sárgadinnye regeneráció jellegzetes fázisai szilárd táptalajon.....	76
5.2.12.	A sárgadinnye regeneráció jellegzetes fázisai folyékony táptalajon	79
5.2.13.	A tökfélék regenerációjának jellegzetes fázisai szilárd táptalajon	81
5.3.	Az antibiotikumokkal szembeni érzékenység tesztelése	84
5.3.1.	Sárgadinnye fajták antibiotikum érzékenységének tesztelése	84
5.3.2.	Tök fajták antibiotikum érzékenységének tesztelése	85
5.4.	A transzformációs kísérletek eredményei.....	85
5.4.1.	Sárgadinnye transzformáció.....	85
5.4.1.1.	A transzformáció lépéseinek körülményei	85
5.4.1.2.	Agar és phytigel bázisú táptalajok összehasonlítása a transzformáció hatékonyságának szempontjából.....	86
5.4.1.3.	A regeneráció és a transzformáció hatékonyságának összehasonlítása	87
5.4.1.4.	A transzformáció jellegzetes fázisai Hale's Best sárgadinnye fajtán	90
5.4.1.5.	A Hógolyó sárgadinnye fajta transzformációjának jellegzetes fázisai	92
5.4.2.	Sütőtök transzformációs kísérletek	93
5.5.	Új tudományos eredmények.....	96
6.	KÖVETKEZTETÉSEK	98
6.1.1.	Sárgadinnye szilárd táptalajon	99
6.1.2.	Sárgadinnye folyékony táptalajon	103
6.1.3.	Tökfélék	108
7.	ÖSSZEFOGLALÁS	110
8.	SUMMARY	112
9.	MELLÉKLETEK.....	114
9.1.	Irodalomjegyzék	114
9.2.	Az értekezés témakörében megjelent publikációk	125
9.3.	Statisztikai számítások	127
9.3.1.	Fertőtlenítési eljárások összehasonlítása	127
9.3.2.	Kilenc sárgadinnye fajta regenerációs képességének vizsgálata ötféle táptalajon	128
9.3.3.	Hale's Best sárgadinnye fajta, növényi részek válaszdó képességének vizsgálata, egy magra visszavezetve.....	131
9.3.4.	Hógolyó sárgadinnye fajta növényi részek válaszdó képességének vizsgálata, egy magra visszavezetve.....	133
9.3.5.	Hógolyó növekedésszabályozó anyag optimalizáció	135
9.3.6.	Hale's best növekedésszabályozó anyag optimalizáció	136

9.3.7.	A patisszon növekedésszabályozó anyag optimalizációs kísérletének értékelése.....	137
9.3.8.	A cukkini növekedésszabályozó anyag optimalizációs kísérletének értékelése.....	138
9.3.9.	A sütőtök növekedésszabályozó anyag optimalizációs kísérletének értékelése.....	139
9.3.10.	Agar és phytigel bázisú táptalajok összehasonlítása regeneráció esetén	140
9.3.11.	A friss és tárolt magokkal végzett kísérlet értékelése	142
9.3.12.	A Muskotály fajtával végzett táptalaj kísérlet értékelése (MD11-16).....	146
9.3.13.	A Hógolyó fajtával végzett táptalaj kísérlet értékelése (MD11-16).....	147
9.3.14.	Az Ezüstananász fajtával végzett táptalaj kísérlet értékelése (MD11 és MD13)	148
9.3.15.	Agar és phytigel tartalmú táptalajok összehasonlítása transzformáció esetén.....	149

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS151

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ABS	abszcizinsav
ACC	aminociklopropán-1-karboxil sav, aminociklopropán-karboxilát oxidáz (-gén)
AT1, AT2	Uborka peronoszpórával (<i>Pseudoperonospora cubensis</i>) szemben rezisztens vad típusú sárgadinnye vonalból (PI 124111F) izolált rezisztencia gén
AVG	aminoetoxivinilglicin
BA (BAP)	benziladenin (α -benzilaminopurin)
BAR	glufozinát herbicidekkel szembeni toleranciát okozó gén
B5	Gamborg et al. (1968)
CMV	Uborka mozaik vírus (Cucumber mosaic virus)
DDV	kétszer desztillált víz
DHFR	dihidrofolát reduktáz
2,4-D	2,4-diklórfenoxiecetsav
GA ₃	gibberellin A3
GUS	β -glukuronidáz (-gén)
HAL1	Sótűrés gén (élesztőből izolált)
IES	indolecetsav
IVS	indolvajsav
2-iP	2-izopentenil-adenozin
PEG	polietilénlikol
KIN	kinetin
MS	Murashige és Skoog által leírt táptalaj (Murashige and Skoog, 1962)
n.a.	Nem áll rendelkezésre adat
N	Nitsch által leírt táptalaj (Nitsch 1951)
N6	Chu és munkatársai által leírt táptalaj (Chu et al. 1975)
NES	α -naftilecetsav
NOS	nopalin szintáz (-gén)
NPT II	neomicin-foszfotranszferáz (-gén)
PCR	polimeráz-láncreakció (Polymerase Chain Reaction)
SqMC	Tök mozaik vírus (Squash mosaic virus)
2,4,5-T	2,4,5-triklór-fenoxi-ecetsav
TDZ	thidiazuron
TPS1	Szárazságtűrés gén (élesztőből izolált)
WMV	Görögdinnye mozaik vírus (Watermelon mosaic virus)
ZEA	zeatin
ZYMV	Cukkíni sárga mozaik vírus (Zucchini yellow mosaic virus)

2. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

A kabakos zöldségnövények vadon vagy termesztett változatban öt földrészen elterjedtek. Termesztésbeli jelentőségüket kiváló étrendi hatásuknak, sokrétű felhasználási lehetőségüknek köszönhetik. A termesztők és fogyasztók igényeinek kielégítéséhez, a folyamatosan változó termesztési technológiák lehetőségeinek kiaknázásához egyre újabb fajtákra van szükség, ugyanakkor cél a kiváló minőség és a táplálkozási érték emelése. Az igényesebb és minőségi táplálkozás fejlődésével az egészségvédő hatások és a minőségi tulajdonságok fokozatosan felértékelődnek.

A sárgadinnye nemesítése hazánkban évszázados múltra tekint vissza. A magyar fajták – régi tájfajták, nemesített konstans- és hibrid fajták – értékes génállománnyal, jó minőségi tulajdonságokkal rendelkeznek (például: sajátos ízek, egészségvédő hatás). Így például a régi tájfajtából szelektált Muskotály sárgadinnyefajta máj és epebetegség számára is fogyasztható. A régi fajták azonban a betegség-ellenállóság és pultállóság hiánya, valamint az új termesztéstechnológiai szempontok (Nagy, 2005) miatt kiszorultak a piacról. Fenntartásuk nagyrészt génbankokban folyik (Szamosi, 2005). Megmentésük és piacra juttatásuk esélyének egyik lehetősége a hiányzó fontos jellegek pótlása genetikai transzformációval. Ez annál is inkább járható út, mivel a minőségi tulajdonságok (omlósság, aroma anyagok, íz és zamatanyagok jelenléte) multigénes jellegük miatt nehezebben módosíthatók, mint a pultállóság vagy a rezisztenciák jelentős része.

A gyakorlati céllal végzett genetikai transzformációs kísérletek többsége rezisztencia tulajdonságok kialakítására irányul. Ellenállóságot alakíthatunk ki a legfontosabb növényi kártevőkkel és kórokozókkal (patogén vírusok, baktériumok, gombák, rovarok), környezeti stressz tényezőkkel (szárazság- és só, hideg, nehézfém és általános stressz), illetve gyomirtó szerekkel szemben. A sárgadinnye esetében már előállítottak uborkamozaik vírussal- és Cukkíni sárga mozaik vírussal szemben ellenálló fajtákat, melyek a vírusok köpenyfehérjét termelik. Fontos nemesítési cél a sárgadinnye és más kabakosok esetében is a minőség, a pultállóság, a cukortartalom, javítása továbbá az egészségvédő antioxidáns kapacitás emelése, valamint a só és szárazságtűrés fokozása. A pultállóság fokozásáról (az etilénszintézis sikeres gátlásán keresztül), valamint a só- és a szárazságtűrés fokozásáról is jelent meg közlemény. További cél lehet még a növényi anyagcsere termékek megváltoztatása, mely során élelmiszer-, illetve gyógyszeripari célból termeltethetünk a növényekkel számos alapanyagot (például: esszenciális aminosavak, növényi olajok, szénhidrátok, vakcinák)

A génbeviteli eljárások általában egy hatékony *in vitro* növényregenerációs rendszerre épülnek. Az *in vitro* növényregeneráció embriogenezisen vagy organogenezisen keresztül valósulhat meg (Dudits és Heszký 2000). A sárgadinnye esetében eddig több esetben is beszámoltak mind direkt, mind kalluszon keresztül történő organogenezis vagy embriogenezis útján történő növényregenerációról és transzformációról, illetve transzgénikus növények előállításáról is, elsősorban külföldi fajták esetében (Fang és Grumet, 1990, Bordas et al., 1997, Curuk et al., 2005). Ezek a módszerek azonban nem elég hatékonyak (Atares et al., 2004). Az eddigi eredmények egyértelműen a genotípus- és környezet-függőséget bizonyítják, vagyis, hogy egy sikeres módszer egy másik genotípus esetében, vagy egy másik laboratóriumban nem ad kielégítő eredményt (Curuk et al., 2005). Ezért a genotípusok *in vitro* válaszadó képességének tesztelése valamennyi genotípus esetében felértékelődött.

Az *in vitro* tenyésztési munka kezdetén célszerű változatos, széles genetikai spektrumból kiválogatni a legmegfelelőbbben reagáló genotípusokat, tesztelve a rendelkezésre álló nemesítési vonalakat, törzseket, illetve a már köztermesztésben levő fajtákat. Ugyanakkor a hatékony regenerációs eljárás megtalálása minden új fajta esetében egy új kihívás, mivel annak ellenére, hogy bizonyos általános elvek érvényesíthetők, a módszer minden egyes lépését az adott fajtára ki kell dolgozni, annak igényeihez hozzá kell illeszteni. Ez a probléma már a kiindulási anyag homogenitásától és állapotától kezdődik. Egy kidolgozott és bevált magfertőtlenítési eljárás nem biztos, hogy egy másik is fajtánál kielégítő eredményt hoz. A magtétélek és évjáratok is eltéréseket okozhatnak a kísérlet eredményeiben. A régi fajták – a szabadbeporzású konstans külföldi fajtákon végzett vizsgálatok alapján tudható – nagyon jelentős fajtán belüli variabilitással rendelkezhetnek. Ezért itt az empirikus bizonyítás elengedhetetlen. Nem építhetünk egyetlen kísérleti lépést sem egy elvre, vagy egy másik fajtán kapott eredményre, hanem kizárólag az adott fajtán bizonyított eredményekre. Így a magyar fajták *in vitro* regenerációs rendszerének kidolgozásánál valamennyi szóba jöhető lépés vizsgálat tárgyát képezheti.

A genetikailag módosított növényfajtákkal szemben a közvélemény jelentős részének fenntartásai vannak. Már az első kísérletek idején felvetődött, hogy ezen növények termesztésének esetleg környezeti, ökológiai kockázata lehet. Ezért szerte a világon a transzgénikus növények laboratóriumon kívüli termesztését és vizsgálatát szigorú engedélyezési eljárások előzik meg. Hivatalosan 1994-ben jelent meg az első transzgénikus növényfajta, a szabályozott érésű paradicsom, az amerikai vetőmagpiacon. Az egyre nagyobb mértékben végzett szabadföldi kísérletek azt jelzik, hogy az elkövetkezendő években számos más genetikailag módosított növényfajta fog megjelenni, megnyitva így egy új fejezetet a

növénynemesítés több évezredes történetében. Ezt a folyamatot gyorsítják az emberi egészség védelmét és a korszerű táplálkozást segítő módosítások, illetve az ilyen fajták előállításai.

A transzgenikus növények előállítása több növényfaj esetében már fontos nemesítési módszerré vált, míg más fajoknál azzá válhat a közeljövőben. Ezért a Budapesti Corvinus Egyetem Genetika és Növénynemesítés Tanszékén az elmúlt néhány évben fokozatosan megteremtették a transzgenikus növények előállításának feltételeit. Az új módszerek minél gyorsabb meghonosítása, alkalmazása és továbbfejlesztése érdekében szoros kapcsolatokat alakítottak ki az ezen a téren élen járó kutatóintézetekkel, valamint azon külföldi és hazai vállalatokkal, melyek a magyar fajták piacra kerülésében érdekeltek lehetnek, és az elvégzett kutatások eredményeinek értékesülését segíthetik.

Munkánk során elsődleges célunk volt, a magyar és hazánkban termesztett külföldi sárgadinnye fajták, valamint néhány más kabakos (cukkíni, patisszon, sütőtök) fajta *in vitro* regenerációs válaszadó képességének tesztelése, illetve a kiválasztott genotípusokra megfelelő *in vitro* regenerációs módszer kidolgozása. Cél volt az is, hogy ez a kidolgozott szövetenyesztési és növény regenerációs rendszer elég hatékony legyen, egyrészt az *in vitro* növénynevelési mikroszaporítási célokra, másrészt megfelelő alapot nyújtson egy transzformációs protokoll kidolgozásához, amellyel olyan hasznos géneket juttathatunk be a jól regenerálódó fajtákba, melyek hatása például a herbicid rezisztencia vagy a vírusrezisztencia. Egy ilyen hatékony rendszer kidolgozásánál a fajták válaszadó képességének eltérései miatt több fajtával kívántunk elindulni.

A fenti célok érdekében a következő feladatokat kellett elvégeznünk:

1. Ki kellett kidolgozni a megfelelő magfertőtlenítési eljárást.
2. A kilenc sárgadinnye fajta és három tökféle válaszadó képességét tesztelve különböző szilárd táptalajokon kívántuk kiválasztani az alkalmas válaszadó fajtákat további kísérletekhez. Folyadékkultúrában egy ismert táptalajon kívántuk a fajtákat válaszadó képesség szerint rangsorolni.
3. A rendszerünkben legjobb válaszdónak mutatózó fajták felhasználásával meg kellett határozni az egyes növényi részek (sziklevel, levél, hipokotil, dekapitált hipokotil) válaszadó képességét szilárd táptalajon.
4. A megfelelő válaszadó fajták és növényi rész kiválasztása után részletesen kívántuk elemezni a növekedésszabályozó anyagok hatását a regenerációra, és egy optimalizációs kísérlet révén megtalálni egy megfelelő auxin-citokinin arányt, az

explantátumokból történő organogenezis vagy embriogenezis indukálására szilárd, valamint folyékony táptalajon.

5. Meg kívántuk határozni az indukció idejének szükséges hosszát szilárd táptalajon és folyadékkultúrában
6. Elemezni kívántuk a szilárdító közegek (agar és phytagel) hatását a regenerációra valamint a regenerált és felnevelt hajtások számára.
7. Folyadékkultúrában meg akartuk határozni a tenyésztés különböző paramétereinek – így a különböző alkalmazott vitaminoknak, a szénforrásoknak (szacharóz, glükóz, maltóz), a pH-nak a hatását az embriogenezis indukcióra.
8. A folyadékkultúrás tenyészetek esetében a tenyészetek indításához felhasznált magok (fiatal és régebben tárolt magok felhasználásával) életkorának hatását megállapítani a szomatikus embriogenezisre.
9. A tenyésztés során alkalmazott indukciós táptalajok és a szilárd továbbtenyésztő táptalajok, passzálások összetételének és a tenyésztés idejének meghatározását a hajtások felnevelése érdekében.
10. Végző feladatunk volt hatékony indukciós és növényregenerációs rendszerek és protokollok felállítása mind szilárd táptalajon, mind folyadékkultúrában.

Ehhez mind a genotípusok, mind a regenerációs feltételek komplex vizsgálatára szükség volt. Munkánk során nem az organogenezis ill. az embriogenezis élettani vizsgálatára, hanem egy biotechnológiailag alkalmazható eljárás hatékonyságának növelésére kívántuk fektetni a hangsúlyt. Különösen fontos volt számunkra, hogy a kifejlesztett módszer nagy hatékonyságú és jól ismételhető legyen.

Mivel ismert, hogy a regenerációs rendszerek hatékonysága a transzformációs eljárások során jelentősen csökken – számos faktor, elsősorban az *Agrobacterium* fertőzés és az alkalmazott szelekciós ágensek miatt – egy megfelelő regenerációs rendszer birtokában meg akartuk állapítani a kidolgozott rendszer hatékonyságát a transzformációs rendszerben, és lehetőleg kiszűrni a kedvezőtlen hatásokat.

Ezekhez a célokhoz a következő feladatokat elvégzését láttuk szükségesnek:

1. Megvizsgálni az infekció és az együtt tenyésztés idejének együttes hatását a regenerációra, valamint a baktérium eliminálásának hatékonyságára.

2. A megfelelő antibiotikum koncentrációk megtalálása, mely egyrészt biztosítja a fertőzéshez használt baktérium mentesítést, másrészt a transzformánsok hatékony szelekcióját.
3. Tesztelni a táptalajt szilárdító agar, illetve phytagel hatását a folyamatra. A rendszer hatékonyságát a meggyökereztetett hajtások és felnevelt növények száma alapján értékelni, vagyis a gyakorlatban hasznosítható növényeket adó rendszert kidolgozni.

Munkánk kezdetén azt a szempontot is szem előtt tartottuk, hogy a kabakos regenerációs rendszer, valamint az erre építhető transzformációs rendszer az akadémiai kutatás számára is felhasználható legyen és hogy hazai, valamint nemzetközi érdeklődésre számot tartó eredményeket érjünk el.

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1. A sárgadinnye jellemzése és jelentősége

A sárgadinnye (*Cucumis melo* L.) a *Cucurbitaceae* családba tartozik, amely alapvetően egy trópusi növénycsalád, több mint 600 fajjal. Több gazdasági szempontból fontos növény tartozik ide, így többek között a tök (*Cucurbita pepo*), az uborka (*Cucumis sativus*) és a görögdinnye (*Citrullus lanatus*) (Borhidi, 1995). A sárgadinnye őshazáját illetően a szakemberek eltérő véleményen vannak. Az egyik csoport Nyugat-Afrikát, a trópusi, szubtrópusi övezetet jelöli, a másik csoport ázsiai, közép-ázsiai övezetbe teszi származását. Tényként elfogadhatjuk e kettős géncentrumot. Az újvilágba Kolumbusz vitte be elsőként. Valószínűleg már a honfoglalás idején termesztették hazánkban ezt a ma is méltán népszerű és igen kedvelt növényt. Sokfelé cukordinnyének is nevezik, ami német nevének szó szerinti fordításából ered. A sárgadinnye mellett, hogy valóban sok cukrot tartalmaz, fontos vitamin (karotin, az E-vitamin, a C-vitamin, B1 vitamin, B2 vitamin, B6 vitamin) és ásványi anyag tartalommal is rendelkezik, valamint nagy értéket képvisel a benne található nyersrost. A sárgadinnye a *Cucurbitaceae* család más tagjaival együtt kiemelt fontosságot kapott az ENSZ világelelmészeti programjában is. A sárgadinnye a szénhidrátok közül glükózt, fruktózt és szacharózt tartalmaz. Az édességet döntően a szacharóz-tartalom határozza meg (Nagy, 2005). Sárgadinnyét az egész világon termelnek és fogyasztanak. A világ termőterülete 2007-ben 1,27 millió hektár, míg a termésmennyiség 26,8 millió tonna volt. A sárgadinnye vetésterületének mintegy 43 százaléka Kínában volt található, itt termelték a világ teljes termésmennyiségének jelentős részét, 51 százalékát. A második legnagyobb termelő Törökország részesedése 6 százalék volt, majd Irán és az Egyesült Államok következett, 4-4 százalékos részesedéssel. Az Európai Unió tagállamai a világ termésmennyiségének mindössze 8 százalékát állították elő 2007-ben (FAOSTAT, 2009). Az Európai Unióban 2008-ban 2,4 millió tonna sárgadinnyét termesztettek, amelynek közel a felét (48%) Spanyolország állította elő. A második legnagyobb termeszto ország Olaszország – 26%-os részesedés –, míg a harmadik Franciaország – 14%-os részesedés – volt. Az elmúlt évben, a belföldi sárgadinnye termés mellé az Unióba nagyobb mennyiségű import érkezett Közép-Amerikából, Marokkóból, valamint Nyugat-Indiából. Magyarországon 2009-ben megközelítőleg 750 hektáron 12 000 tonna sárgadinnyét ütettek. Az elmúlt évek tapasztalat alapján az egy főre eső sárgadinnye fogyasztásunk 1.6 kg-on stagnál. (Fodor és Jasper, 2009).

3.2. A tökfajok jellemzése és jelentősége

A patisszont és a cukkínit a főzőtök fajtacsoportba soroljuk. A főzőtökök gyökérzete a növekedési típussal szoros összefüggésben van, a termesztett zöldségfajok közül a legnagyobb gyökérzetet fejlesztik. A hajtás keresztmetszete szögletes vagy barázdált. Lehet rövid, félhosszú és hosszú. A rövid hajtáshossz 50-150 cm között változik, általában egyedül áll, nem, vagy csak ritkán ágazódik el. A középhosszú és hosszú hajtásokat fejlesztő fajták hajtásrendszere 1.5-6 méter hosszú is lehet, gyakorta elágazódik (Nagy, 1997). A tök virágai lényegesen nagyobbak az uborka és a dinnyék virágainál. A virág lehet egylaki és kétlaki hím, nő- és hímnős. A tisztán nőtípusú virágok elsősorban a cukkínin fordulnak elő. A sütőtök gyökérzete nagy tömegű, a talajt behálózza. Hajtása folytonos növekedésű, gyakorta elágazó, több méterre (több 10 méterre) megnövő. Levele lekerekített, vese alakú, szőrözött. Virágai a kabakosok közül a legnagyobbak élénksárga színűek (Nagy, 1997). A nálunk termesztett tökfajok Amerika trópusi, szubtrópusi vidékeiről származnak. A *Cucurbita pepo* (patisszon, cukkini) őshazája Észak-Mexikó és az Egyesült Államok keleti vidéke. A *Cucurbita maxima* (sütőtök) Bolívia, Argentína és Chile területéről származik (Kapás, 1986). A tökfélék közül a spárgatököt, sütőtököt, istengyalulta tököt régóta termesztjük (Nagy, 1997). A patisszon és a cukkini hazánkban meglehetősen új zöldségféle. Fogyasztásuk az utóbbi években jelentősen megnövekedett, más földrészen és országokban azonban már régebben ismert. A patisszont Európában sokáig elsősorban dísztökként ismerték. A legjobban Franciaországban terjedt el, ezenkívül csaknem az összes európai országban ismerik (Kapás, 1986). Kis energia-, de nagy vitamin- és ásványianyag-tartalmuk folytán kiváló étrendi hatásúak, diabetikus ételek kiváló alapanyagai. Folyamatos terméshezásúak, semleges alap ízűek, szín- és alakgazdagságuk munkatakarékos feldolgozással párosul (Nagy, 1989). A FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) statisztikailag együtt kezeli a sütőtök és a főzőtökök adatait. A tökfélék termesztése 1,55 millió hektáron folyt a világon 2007-ben, összesen 21 millió tonnát termeltek. Annak ellenére, hogy a tökök őshazája Amerika, a legnagyobb termesztési területet e fajokból is Ázsiában találjuk. A termelt mennyiség szerinti további sorrend Európa, Afrika, Közép-Amerika és a Karib térség, majd Észak-Amerika, Dél-Amerika és Óceánia. A világon megtermelt sütő és főzőtök felét három ország, Kína (30%), India (16%), és Oroszország (6%) adta. Az Európai Unió 5 százalékkal részesedett a világ termeléséből. A legnagyobb termelők Olaszország, Spanyolország és Franciaország voltak, ők hárman az Európai Unió termésmennyiségének a 70 százalékát állították elő. A FAO becslése

szerint Magyarországon 2007-ben 11600 tonna tök félét termesztettek 500 hektáron (FAOSTAT, 2009).

3.3. A növényregenerációs módszerek

A növényi biotechnológia egyik legfontosabb elve, hogy a tenyésztett szomatikus sejtekből egészséges, életképes intakt növények regenerálhatók (Dudits és Heszky, 2000). A növényi sejtek totipotenciájukat hosszú ideig megtartják, ezért képesek például a hajtások gyökereket létrehozni, általában a növényi szervek reparálódni és regenerálódni. Az állandósult sejtek totipotenciájukat részben vagy egészben vissza nyerik, (dedifferenciálódnak), és belőlük egy új növény fejlődhet, vagy sérüléssel elvesztett részek pótlódhatnak (Szalai, 1994). Az *in vitro* morfogenezis leggyakoribb útja az, hogy a dedifferenciálódás sikeres indukcióját követően a táptalajra helyezett növényi rész sejtjei intenzíven osztódnak, és dedifferenciálódott sejtek tömege, kallusz alakul ki. Kallusz szövetekben a sejtosztódás véletlenszerű módon megy végbe, minden irányban, nincs polaritás tengely. Az eredmény egy szervezetlen sejttömeg lesz. A differenciálatlan sejtek különböző irányú (pl. gyökérfejlődés, hajtásfejlődés) indukciója lehetséges. Ezt a folyamatot nevezzük redifferenciálódásnak. A növényregeneráció folyamán az a cél, hogy a differenciálatlan sejtekből növényt kapjunk, azaz az egyedfejlődést (ontogenezist) indukáljuk (Dudits és Heszky, 2000).

3.3.1. Organogenezis

A morfogenezis leggyakoribb útja, melynek során a táptalajra helyezett növényi rész sejtjei az indukciót követően intenzíven osztódnak és dedifferenciálódott sejtek tömege, kallusz alakul ki (Dudits és Heszky, 2000). A kallusz szövetekben a sejtosztódás véletlenszerű módon megy végbe, minden irányban, nincs polaritás tengely. Az eredmény egy szervezetlen sejttömeg lesz. Az osztódás eredményeként izodiametrikus, vékony falú merisztemoid jön létre, amelyből az endogén és az exogén növekedésszabályozó anyagok (indolecetsav, gibberellin, benziladenin és etilén) kritikus szintjétől függően gyökér, vagy hajtáskezdemény alakulhat ki (Szalai, 1994). Az organogenezis általában egyszerre több kallusz sejt egyidejű redifferenciálódásának eredménye. Végeredményben az organogenezis során egypólusú tenyésző kúpok alakulnak ki, melyekből hajtások vagy gyökerek fejlődnek. Az ellentétes pólus regenerálódását általában más növekedésszabályozó anyag összetételű táptalajon kell indukálni. Organogenezisen belül megkülönböztethetünk direkt illetve indirekt organogenezist. Indirekt organogenezisről akkor beszélhetünk, ha egyszerre több kalluszsejt egyidejű

differentiálódásának eredményeképpen hajtás- vagy gyökérmerisztéma alakul ki. Direkt organogenezis esetén, - a kallusz fázist kihagyva -, nem közvetlenül a kalluszsejtekből, hanem a tenyészetben már differenciálódott merisztéma-, szár- ill. gyökérsejtek további morfogenezisének eredményeképpen kapunk különböző növényi részeket (Dudits és Heszky, 2000).

3.3.2. Szomatikus embriogenezis

A sejtekből a teljes növényre való fejlődésnek a másik útja, amikor a kallusz tömegben valamely sejt bipolárisává válik és a továbbiakban ennek megfelelően osztódik. A fejlődő embrió fokozatos szerveződésének következtében előbb a soksejtes gömbalak, majd a szív- és torpedóstádium figyelhető meg. Az így keletkezett csíranövényszerű képződmény a kallusztól elkülönül és leválik. Ezt követően a sziklevelek fejlődése általában megáll, és megindul az embrió szöveteinek differenciálódása. Ezt a jelenséget járulékos (adventív) embrióképzésnek nevezzük (Dudits és Heszky, 2000). A szövettenyészetben az adventív embrió a kallusz felszínén elhelyezkedő egyetlen sejtől keletkezik, és a környező kallusz sejtek az embrió fejlődésében „tápláló szövetként” szerepelnek. Az embriónak az embriogenezis korai szakaszában szüksége van tápláló sejtekre (Gyurján, 2004). A szomatikus embriogenezis tehát mindig egyetlen sejtől indul ki és morfológiailag alig tér el a zigotikus embriogenezistől. Fehér és munkatársai (2002) kísérleteik során igazolták a növényi növekedésszabályozó anyagok, elsősorban az auxinok (így a 2,4-D) alapvető szerepét a szomatikus embriogenezis kiváltásában lucerna esetében. Továbbá megállapították, hogy az embriogén fejlődés elindításában a stressz és az általa kiváltott védekező reakciók döntő szerepet játszanak. Általános probléma, hogy a kis légterű nevelőedényekben endogén etilénfelhalmozódás léphet fel. Ennél a jelenségnél két tényező játszik szerepet: az egyik az etilénképződés, a másik a nevelőedény és a külvilág közötti gázcsera mértéke. Intenzív etilénképződés leggyakrabban az auxinok mellékhatásaként tapasztalható. Különösen erős lehet az etilénképződés 2,4-D adagolásakor, ami közvetve kedvezőtlenül befolyásolja, sőt akár gátolhatja is a szomatikus embriogenezis indukcióját (Tóth, 2005).

3.4. A sárgadinnye regeneráció módszerei

Külföldi sárgadinnyefajtákkal az első sikeres regenerációs kísérletet Blackmon és munkatársai (1981) írták le, azonban ez a jelentés csak embriók sikeres indukciójáról számolt be. Moreno és munkatársai (1985) számoltak be elsőként teljes növényregenerációról, amikor a regenerált növényt sikerült meggyökereztetni és kiültetni. Ez a kutatócsoport az Amarillo

Oro fajta esetében sziklevélből és hipokotilból direkt, illetve indirekt organogenezis útján regenerált növényt különböző növekedésszabályozó anyagok használatával. A sárgadinnye regenerációk kiindulási anyagának megválasztása eleinte eléggé változatos volt. A szerzők többsége többféle és különböző korú növényi részt kipróbált, így beszámoltak még többek között hipokotil eredetű kalluszból (Kathal et al., 1986), levélből (Kathal et al., 1988), protoplasztból (Li et al., 1990), sőt gyökérdarabokból (Kathal et al., 1994) történt sikeres növényregenerációról. Niedz és munkatársai (1989) sziklevélből, hipokotilból, levélnyélből és első lomblevélből direkt organogenezis útján regeneráltak növényeket többféle növekedésszabályozó anyagot és azok kombinációját kipróbálva. A szerzők nagyobb része több fajta regenerációs képességét is vizsgálta. A legtöbb fajtát Gray és munkatársai (1993) vizsgálták meg. Regenerációs kísérleteik során egy fajta (Male Sterile A147) éretlen mag sziklevelét felhasználva optimalizálták a növekedésszabályozó anyagok összetételét és a kidolgozott módszert 51 különböző az amerikai vetőmagpiacon éppen elérhető fajtán tesztelték. A kísérleteket összehasonlítva elmondhatjuk, hogy a sziklevel általánosan jó kiindulási anyagnak bizonyult. Elsősorban a sziklevelek alsó része (Gray et al., 1993), a sziklevélnyélhez közeli rész, illetve a hipokotil volt a legjobb válaszadó (Curuk et al., 2002a). Az indolecetsav alacsony koncentrációban organogenezist, magas koncentrációban embriogenezist indukál (Tabei et al., 1991). A táptalajok többségéhez agart használtak szilárdító anyagként, azonban a későbbi kísérletekben már a phytagelt illetve gelrite-ot is alkalmazták a hatékonyabb regeneráció érdekében. Ficcadenti és Rotino (1995) szerint az agart tartalmazó táptalajon történt regeneráció hatékonyabb volt, mint amikor gelrite-ot alkalmaztak. Yadav és munkatársai (1996) több kísérletben is vizsgálták, hogyan befolyásolja a regeneráció hatékonyságát a táptalaj szilárdító anyaga. Azt állapították meg, hogy a phytagelt alkalmazva több regeneráns képződött ugyanolyan növekedésszabályozó anyag összetétel mellett.

A sikeres szomatikus embriogenezishez és az indirekt organogenezishez általában kétféle táptalajra volt szükség: egy indukciós táptalajra, amely az embriók vagy hajtáskezdemények kialakulását váltotta ki a növényanyagból, aztán pedig egy növekedést serkentő közegre, amely az embriók illetve hajtáskezdemények továbbfejlődését segítette (Debeaujon és Branchard, 1993). Ismert az is, hogy a pH-nak jelentős szerepe van az embriogenezis indukciójában (Martin és Rose, 1975; Skirvin et al., 1986; Kovács et al., 1995). Ennek hatását sárgadinnye esetében még nem vizsgálták. Újabban a sárgadinnye esetében is beszámoltak, folyadékkultúrákban embriogenezisen át történő sikeres

növényregenerációról. Ezen kísérletek során is erős genotípus függést tapasztaltak (Akasaka-Kennedy et al. 2004; Ezura és Akasaka-Kennedy 2004).

A dinnyefélék és általában a kabakosok nehezen regenerálódnak *in vitro* rendszerekben. A görögdinnye (Zarka és Szalai, 2005), a tök (Bisztray et al. 2005) az uborka (Gémesné és Kirilla, 2005) és a sárgadinnye (Kissné Bába és Bisztray, 2005) mikroszaporítása, illetve a hatékony *in vitro* regenerációs rendszer felállítása nehéz és genotípusfüggő. Magyar sárgadinnye regenerációjáról eddig egyetlen cikk számolt be. Bársony és munkatársai (1999) sikeresen indukáltak organogén hajtáskezdeményeket Hógolyó fajtán. A könnyebb áttekinthetőség érdekében az irodalomban leírt eredményeket táblázatban foglaltam össze, feltüntetve a felhasznált sárgadinnye fajtát és növényi részt, a táptalajokat és a regeneráció módját (**1. táblázat**).

1. táblázat A sárgadinnye (*Cucumis melo*) *in vitro* növényregeneráció néhány eredménye összefoglalva a felhasznált növényanyag és táptalaj tekintetében, ahol nincs másként feltüntetve ott értelemszerűen MS alapú táptalajt használtak (A rövidítések jegyzékében (1. fejezet) megtalálhatóak a táblázatban szereplő rövidítések)

Felhasznált genotípusok	Növényi rész és kora (nap)	Indukciós táptalaj (mg/l)	Növekedési táptalaj (mg/l)	Regeneráció módja	Hivatkozás
Banana	hipokotil	N, különböző növ. szab. anyagok	-	szomatikus embriogenezis	Blackmon et al., 1981
Amarillo Oro	sziklevel és hipokotil (11-13)	IES (1.5), KIN (6)	IES(0.01), BA (0.1)	indirekt organogenezis	Moreno et al., 1985
		IES (4.5),	-	direkt organogenezis	
Sunday Akigata	sziklevel kallusz szuszp.	2.4-D (1), BA (0.1)	hormon mentes	szomatikus embriogenezis	Oridate és Oosawa, 1986
Hale's Best, Rocky Ford	sziklevel (5)	2.4-D(1), BA (0.5)	2.4-D(0.5), BA (0.25)	szomatikus embriogenezis	Trulson és Shahin, 1986
Pusa Sharbati	hipokotil (7)	IES(1), KIN (0.5)	BAP(0.5), 2-iP(0.5)	indirekt organogenezis	Kathal et al., 1986
Cantaloup charentais T	sziklevel	2.4-D (1), BAP (0.1)	hormon mentes	szomatikus embriogenezis	Branchard és Chateau, 1988b
Cantaloup charentais T	sziklevel protoplaszt	B5, 2.4-D (1) NES (0,5) BAP (0.5)	IES(2.5), BAP(1)	szomatikus embriogenezis	Debeaujon és Branchard, 1988
Pusa Sharbati	levél (14)	BAP(0.225), 2-iP(0.203)	-	direkt organogenezis	Kathal et al., 1988
Hale's Best Jumbo Superstar Goldstar Hearts of Gold	sziklevel (4)	IES (0,88), BA (1.13), ABS (0.26)	-	direkt organogenezis	Niedz et al., 1989
Accent, Galia, Preco, Viva	levél, sziklevel	BA (1)	-	direkt organogenezis	Dirks és Buggeum, 1989
Earl's Favourite	érett zigotikus embrió	N6, 2.4-D (3), BA (1)	N6	szomatikus embriogenezis	Oridate és Yasawa, 1990
Haru 1, Natsu 1, Aki 1	szár, levél, hajtáscsúcs	2.4-D (1), NES (2)	BA(0.1)	szomatikus embriogenezis	Kageyama et al., 1990

Felhasznált genotípusok	Növényi rész	Indukciós táptalaj (mg/l)	Növekedési táptalaj (mg/l)	Regeneráció módja	Hivatkozás
Hong-Xin-Cui (Xinjiang)	sziklevél protoplaszt (14)	N6, 2,4-D (0.5), ZEA (0.5) BA (0.5)	N6, 2,4-D (0.3), ZEA (1) BA (0.5)	szomatikus embriogenezis	Li, et al., 1990
Cantaloupe, PMR	levél, levélnyel (21-28)	NES (0.9), BA (1.8)	hormon mentes	indirekt organogenezis	Punja et al., 1990
Earl's Favourite Harukei	sziklevél, levél, hipokotil, levélnyel (10-21)	2,4-D (2) vagy BA (25)	hormon mentes	szomatikus embriogenezis	Tabei et al., 1991
		2,4-D (0.01) vagy IES (1)	-	direkt organogenezis	
Topmark	sziklevél (9-10)	BA(1)	-	direkt organogenezis	Chee, 1991b
Earl's Favourite Haru 1	sziklevél (1)	2,4-D (1), NES (1) BA (0.1)	hormon mentes	szomatikus embriogenezis	Kageyama et al., 1991
Cantaloup charentais T Preco (F1)	sziklevél és levél protoplaszt (12)	2,4-D(1), BA (0.1)	hormon mentes	szomatikus embriogenezis	Debeaujon és Branchard, 1992
		BA (0.75)	2,4-D(1), BA (0.1)	indirekt organogenezis	
5 fajtajelölt (Téziars)	sziklevél (7)	NES (0.1), BA (0.5) + AgNO ₃	-	direkt organogenezis	Roustan et al., 1992
Prince, Andes, Amus	hajtáscsúcs-darabok (28)	BA(1)	-	direkt organogenezis	Ezura et al., 1992
		2,4-D (1), NES (2), BA (0.1)	hormon mentes	szomatikus embriogenezis	
18 fajta	sziklevél, hipokotil	N6, (folyékony) 2,4-D (3), BA (0.1)	N6	szomatikus embriogenezis	Oridate et al., 1992
52 fajta	éretlen mag sziklevele	2,4-D (5) TDZ (0.075)		szomatikus embriogenezis	Gray et al., 1993
Pusa Sharbati	gyökér	BA (0.67) 2iP (0,61)	BA(0.225)	indirekt organogenezis	Kathal et al., 1994
Miniloup L14 B-line	érett és éretlen mag sziklevele	BA (2.25)	BA(0.225)	direkt organogenezis	Adelberg et al., 1994
Prince Sunday Aki	beáztatott érett magból kivágott embrió	2,4-D (1), NES (2), BAP (0.1)	-	szomatikus embriogenezis	Ezura és Oosawa, 1994
Cantaloup charentais T	levél, sziklelevél, hipokotil (11-13)	NES (2.5) BA (1)	NES (0.01) KIN (6)	indirekt organogenezis	Molina és Nuez, 1995a
Cantaloup charentais T	levél	IES (0.77) KIN (2,5)	-	direkt organogenezis	Molina és Nuez, 1995b
11 különböző genotípus	sziklevél (4-5)	MS vagy B5, BA (0.63), ABS (0.26)	hormon mentes	direkt organogenezis	Ficcadenti és Rotino, 1995
Galia	sziklevél alsó része (4)	BA (1), +ancymidol (1.18µM)	-	direkt organogenezis	Gaba et al., 1996
Pusa Madhuras	sziklevél és hipokotil (7)	BA (0.225)	-	direkt organogenezis	Singh et al., 1996

Felhasznált genotípusok	Növényi rész	Indukciós táptalaj (mg/l)	Növekedési táptalaj (mg/l)	Regeneráció módja	Hivatkozás
Hale's Best és Ananas El Dokki	levél	IES (0.88), BA (1.13), ABS (0.26)+ AgNO ₃ (5.1)	BA (0.05)	direkt organogenezis	Yadav et al. 1996
Rocky Ford Green Flesh, Super Market, Top Mark	érett mag feldarabolva	2,4-D (5), TDZ (0.1)	hormon mentes	szomatikus embriogenezis	Gray, 1996
Védrantais (Cantaloup)	sziklevel alsó része	2,4-D (2,2), BA (0.11)	hormon mentes	szomatikus embriogenezis	Guis et al., 1997
14 fajta	sziklevel (14)	2,4-D (0.01) BA (0.059)	-	direkt organogenezis	Kintzios és Taravira, 1997
		2,4-D (1.98) KIN (4.99)	hormon mentes	szomatikus embriogenezis	
Hógolyó	sziklevel (3)	IES (2.4), BA (2.5)	hormon mentes	direkt organogenezis	Bársony et al., 1999
Galia	sziklevel alsó része	BA (1)	-	direkt organogenezis	Gaba et al., 1999
Yellow Queen Yellow King AF-222	érett mag sziklevele, levél	BA (1)	-	direkt organogenezis	Liborio-Stipp et al., 2001
Yellow Queen Yellow King	érett mag sziklevele	2,4-D (5) TDZ (1)	GA ₃ (1)	szomatikus embriogenezis	
Hale's Best	sziklevel (7)	BA (2) IES (0.5)	-	direkt organogenezis	Abrie és van Staden, 2001
Galia	első lomblevél (2,4-D-vel vagy kinetinnel előkezelt)	2,4-D (0.5), KIN (0.2)	hormon mentes	szomatikus embriogenezis	Kintzios et al. 2002
Revigal	hipokotil (4)	BA (1)	-	direkt organogenezis	Curuk et al., 2002a
Revigal, Topatan, Kirkagac 637, Hansabey, Kuscular, Yuva	sziklevel (4, 5, 6)	Niedz et al., 1989 Moreno et al., 1985	-	direkt organogenezis	Curuk et al., 2002b
30 genotípus (BU21/3)	sziklevel (2)	BAP (1)	-	direkt organogenezis	Galperin et al., 2003a
Revigal, Topmark, Kirkagac 637	hipokotil (4)	BA (1)	-	direkt organogenezis	Curuk et al., 2003
Bolero, Daniel	sziklevel (28)	BA (0.6)	-	direkt organogenezis	Kintzios et al., 2004
		IVS (1) BA (1)	hormon mentes	szomatikus embriogenezis	
Maazoun Beji	hipokotil, sziklevel, érett zigotikus embrió (10)	2,4-D (0.25) BA (0.5)	hormon mentes	szomatikus embriogenezis	Rhimi et al., 2006

3.5. A tökfélék regenerációjának módszerei

A tökfélék regenerációjával több szerző is foglalkozott az elmúlt években. Elsőként Schroeder (1968) számolt be cukkini regenerációjáról húsos termésfalból embriogenezis útján. Jelaska pedig 1972-ben leírta, hogy tök hipokotil- és sziklevéldarabokból embriogenezis útján sikerült normál növekedésű növényeket felnevelnie. Kiindulási explantátumnak a többi kísérletben is általában sziklevelet és hipokotilt (Jelaska, 1974; Jelaska et al., 1985; Juretic és Jelaska, 1991) használtak. Lee és munkatársai (2003) megállapították hogy a sziklevelek esetében elsősorban a félbe vágott sziklevel alsó része volt a legalkalmasabb hajtásindukcióra. Ezeken kívül lomblevelek levéllemező- és levélnyéldarabjaiból (Kintzios et al., 2002), náduszkultúrából (Juretic et al., 1989), internódiumoknál feldarabolt szárdarabokból (Rahman et al., 1993) hajtáscsúcsból (Shah et al. 2008), ováriumból (Kwack és Fujieda, 1988; Metwally et al., 1998a) és portokból (Metwally et al., 1998b) kiindulva is sikeres regenerációról számoltak be. Fontos kiemelni, hogy a növényregeneráció leggyakrabban szikleveléből (Jelaska, 1972; Katavic et al., 1991; Chee, 1992; Gonsalves et al., 1995; Abrie és van Staden, 2001; Lee et al., 2003; Urbanek et al. 2004; Zang et al., 2008) volt indukálható. A folyamat általában kallusz fázison át vezetett, és hatékonysága erősen genotípusfüggő volt (Bisztray et al., 2005). Az alábbiakban röviden ismertetünk néhány eredményes regenerációs kísérletet:

Rakoczy-Trojanowska és Malepszky (1989) *C. maxima* × *C. pepo* hibridek F1 és BC1 nemzedékében éretlen embriók szikleveléből növekedésszabályozó anyag mentes MS táptalajon, direkt módon, kallusz fázis nélkül indukáltak hajtás képződést. A hajtások gyökereztető táptalajon növényekké fejlődtek.

Chee (1991a) *C. pepo* hajtásmerisztéma eredetű kalluszában MS táptalajon 1.2 mg/l 2,4,5-T, 0.8 mg/l BA, 0.1 mg/l kinetin hozzáadása mellett ugyancsak embrióképződés tudott beindítani. Az éretlen embriókat továbbnevelte szintén MS alapú táptalajon, azonban már 0.05 mg/l NES-val illetve 0.05 mg/l kinetinnel egészítette ki, így végül egészséges növények fejlődtek.

Juretic és Jelaska (1991) *C. pepo* hipokotildarabjaiból nyertek embriógén kalluszt és azt 15 évig képesek voltak fenntartani. Az embriogenezishez IES, IVS, 2,4-D, és ABS különböző kombinációit próbálták ki.

Chee (1992) *C. pepo* cv. YC60 érett magvainak sziklevéldarabjait 4.7 µM 2,4,5 - T, 4 µM BA és 0.5 µM kinetin tartalmú MS táptalajon tenyésztve a képződött kalluszban

embriógén gócok jelentek meg. Az embriók továbbnevelésére 0.5 μ M NES és 0.25 μ M kinetin tartalmú MS táptalajon történt.

Rahman és munkatársai (1993) publikációja szerint nagy gyakorisággal képződött hajtás egy hibrid tök (*Cucurbita maxima* \times *C. moschata*) szárdarabjain MS táptalajon 4.4 μ M BA és 0.54 μ M NES hozzáadása mellett. A hajtások direkt regeneráció útján képződtek. A növények gyökereztetése 0.54 μ M NES tartalmú 1/2 MS táptalajon történt.

Gonsalves és munkatársai (1995) hat *C. pepo* fajtát regeneráltattak csírázó vagy még nem csírázó magvak leválasztott szikleveleiből embriogenezis útján. A 22.62 μ M 2,4-D tartalmú indukciós táptalaj után 0.27 μ M NES és 0.23 μ M kinetin tartalmú embriónövesztő közeget, majd növénynevelésre és gyökereztetésre növekedésszabályozó anyag mentes MS táptalajt használtak. Az indukciós táptalajon 11-17 hét után minden sziklevélen megjelentek embriók. A növényneveléshez általában 13-15 hetes indukció volt optimális. Kedvező esetben a letett sziklevek 70-90 %-áról 4-9 kis növény volt nyerhető sziklevéldarabonként. A módszer, bár különböző hatékonysággal, de minden vizsgált fajta esetében hatékony volt.

Metwally és munkatársai (1998a) a *C. pepo* (Eskandarini) virágnyílás előtt egy nappal kipreparált ováriumát először indukciós táptalajra (MS + 1-5 mg/l 2,4-D) helyezték, majd négy hét elteltével növekedésszabályozó anyag mentes MS táptalajra helyezve növényeket kaptak (8.8-9.1 embrió/100 ovárium). % közötti hatékonysággal. A portoktenyészeteknél az MS + 150 g/l szacharóz és 5 mg/l 2,4-D tartalmú táptalaj volt hatékony (Metwally et al., 1998b). A portokokból fejlődő kalluszokból kalluszonként átlagosan 19.2 növényt kaptak. A citológiai vizsgált 20 növény fele bizonyult haploidnak ($2n=x=20$).

Lee és munkatársai (2003) *C. maxima* fajták (Juktoja, Miyako) *in vitro* csíráztatott sziklevéldarabjaiból organogenezis útján regeneráltattak növényt. Különböző korú növényeket és különböző növekedésszabályozó anyag koncentrációjú táptalajokat próbáltak ki. A legjobb eredményt a négy napos növények sziklevéldarabjait 1.0 mg/l BA tartalmú MS táptalajra téve kapták. Három hét alatt a sziklevéldarabok 82-86 %-a regenerált hajtást. A növények növekedésszabályozó anyag mentes MS táptalajon 2 hét alatt gyökeret fejlesztettek. A fejlődött növények nagy része diploid volt.

Ananthakrishnan és munkatársai (2003) három különböző *C. pepo* fajtát (True French, Ma'yan, Goldy) vizsgálva megállapították, hogy a regeneráció hatékonyabb, - ha a hajtáscsúcsot eltávolítva -, a félbe vágott sziklevel (5-9 napos) alsó darabját, körülbelül 1 mm hosszúságú hipokotil résszel együtt helyezzük regenerációs táptalajra (1 mg/l BA). Ha csak a sziklevel alsó darabját, vagy 1 mm-nél hosszabb hipokotil részt hagytak meg, illetve ha a hipokotil és sziklevel közötti részt önmagában rakták le regenerációs táptalajra, akkor a

regeneráció hatékonysága szignifikánsan lecsökkent. Ha a sziklevel alsó részébe legalább 2 mm mélyen belevágtak a hipokotil felől, vagy önmagában a néhány milliméteres hipokotildarabot rakták regenerációs táptalajra, akkor egyáltalán nem kaptak regeneráns növényt. Az általuk sikeresen regenerált növények mind diploidok voltak.

Urbanek és munkatársai (2004) olajtök (*Cucurbita pepo* L. subsp. *pepo* var. *styriaca* Greb.) hét napos sziklevelét felhasználva, szomatikus embriogenezist indukáltak 3 mg/l NES és 1 mg/l BA tartalmú táptalajon. Az átlagosan 3-4 hónap alatt keletkezett embriókat 1 mg/l IES és 0.5 mg/l BA tartalmú táptalajon tovább nevelve 9-10 hét alatt gyökeres növényeket kaptak.

Kathiravan és munkatársai (2006) Ananthakrishnan és munkatársai (2003) módszerét alkalmazva 15 különböző tökfajtán (*Cucurbita texana* - Acorn, Tay-Belle, Nova, Early Prolific Straightneck, Creamy, Early Summer Crookneck, Small Bicolor, *Cucurbita pepo* - Ma'yan, Tondo di Nizza, Jugoslavia 7, Beirut, Bolognese, Goldy, True French, Zuchit) sikeres regenerációt hajtottak végre. A hatásregeneráció hatékonysága egységesen 1.2-1.6 hajtás/sziklevéldarab volt, kivéve a True French esetében ahol 3.9 hajtást is tudtak regenerálni sziklevéldarabonként.

Ananthakrishnan és munkatársai (2007) tovább kívánták fokozni a regeneráció hatékonyságát ultrahangos kezeléssel. Azt tapasztalták, hogy a Ma'yan és Barequet (*C. pepo*) fajtákon a 0.5-2 perc közötti időtartamú ultrahangos kezelések akár ötszörösére is megnövelték a hajtásindukciót. Ha ennél hosszabb ideig kezelték a sziklevéldarabokat ultrahanggal, akkor már vitrifikáció lépett fel a regeneráció során.

Zang és munkatársai (2008) megvizsgálták a *Cucurbita moschata* Duch. 'Non-vine 1' fajta regenerációs képességét, valamint hogy az endogén hormonszint befolyásolja-e a regeneráció hatékonyságát. Négy különböző korú (4, 5, 6, 7 napos) sziklevéldarabot vizsgáltak négy különböző BA (0, 0.5, 1, 2 mg/l) koncentrációjú táptalajon és azt találták, hogy a 7 napos szikleveleken volt leghatékonyabb a regeneráció, azonban a BA mennyiségének növelése a táptalajban nem mutatott szignifikáns különbséget a kezelések között. Az endogén hormonszintet vizsgálva a különböző korú sziklevelekben viszont összefüggést találtak a 2iP tartalom és a sziklevel életkora között. A 7 napos sziklevelekben szignifikánsan több 2iP keletkezett, így ez okozhatta, hogy az ilyen korú sziklevéldarabból volt leghatékonyabb a regeneráció.

A Ma'yan fajtából Amutha és munkatársai (2009a) sikeresen regeneráltak teljes növényt dekapitációval. Az üvegházban felnevelt szikleveles stádiumban lévő tök növény sziklevelei közé csúsztatták a szikét, majd kivágták a hajtáscsúcsot és az egyik sziklevelet egy

kis hipokotil résszel együtt. A sebzési felületen a regeneráns növények levelei először kissé deformáltak voltak, azonban a későbbi levelek már normál levélalakkal rendelkeztek.

Mindezek felett Amutha és munkatársai (2009b) több mint kilenc éven át tartó kísérletsorozatban megvizsgálták, hogy a Ma'yan és Barequet fajták magjainak 4 °C -on történő tárolása, befolyásolja-e a regenerációs képességet. A szikleveleket Ananthakrishnan és munkatársai (2003) által leírt módszer alapján használták fel. Azt állapították meg hogy a tárolt magok regenerációs képessége nem hogy nem csökkent, hanem még növekedett is a tárolás során.

3.6. Génbeviteli eljárások

Génbevitelnek nevezzük azt a folyamatot, amely során egy idegen DNS egy darabja belekerül a protoplasztokba, vagy intakt sejtekbe. A növényi génsebészeti kutatásban a gén- (DNS) bejuttatás módjait többféleképpen csoportosíthatjuk az alkalmazott technikák, és a felhasznált növényi részek, (sejtek, szervek, szövetek) alapján, amelyek a génbevitel célpontját képezik. A génbevitel módját tekintve a csoportosítás alapjaként megkülönböztethetünk indirekt és direkt transzfer módszereket (**2. táblázat**)

2. táblázat A genetikai transzformáció fontosabb módszerei növényeknél (Jenes,1999).

Indirekt génbejuttatás	Direkt génbejuttatás	
	Protoplasztba	Intakt sejtekbe
<i>Agrobacterium</i> vektorok Virális vektorok	Kémiai kezelés(PEG)	Makroinjektálás
	Elektroporáció	Szárított embrió
	Kombinált eljárás	Pollentömlő módszer
	Mikroinjektálás	Mikrotű eljárás
	Ultrahangos kezelés	Génbelövés

A **direkt DNS-beviteli** rendszerek a következők:

A kémiai eljárás során a protoplaszt szuszpenzióhoz idegen DNS-t tartalmazó oldatot adunk hozzá, majd ebbe csepegtetjük a polietilén-glikolt (PEG). A protoplasztok felszínére tapadt molekulák fúzió révén kerülnek be a citoplazmába (Dudits és Heszky, 2000).

Az elektroporáció a nagyfeszültségű, rövid időtartamú elektromos impulzusok használatára alapozott módszer. A protoplaszt membránján átmenetileg lyukak képződnek, amelyeken keresztül az idegen DNS bejuthat a sejtbe. Fromm és munkatársai (1985) adtak

hírt elsőként kukorica protoplasztokba történő sikeres génbevitelről az elektroporáció alkalmazásával.

A kombinált fizikai és kémiai kezelés során a protoplaszt-DNS szuszpenzióhoz PEG oldatot adnak, majd ezt követően elektroporálják a protoplasztokat.

A mikroinjektálás során mikrokapillárisok és mikroszkópi eszközök felhasználásával DNS-t visznek be a sejtek citoplazmájába, sejtmagjába vagy organellumaiba, és amennyiben az injektált sejt túléli a beavatkozást, osztódni kezd.

Az ultrahanggal történő génbevitel az utóbbi évek új módszerei közé tartozik, olyan növényeknél alkalmazzák, ahol a protoplasztrendszer már létezik, illetve a kalluszból történő növényregenerálás könnyen indukálható. A puffer-oldatban lévő transzformálandó sejteket rövid ideig magas frekvenciájú ultrahang hatásának teszik ki, így az idegen DNS bejuthat a növényi sejtbe (Jenes, 1999).

Makroinjektálás növényi szövetekbe. Ezen eljárás során nem különálló sejtekbe juttatják az idegen DNS-t, hanem embriogén (regenerálható) sejtcsoportokba.

Száritott embriók DNS oldatban történő áztatása. A száraz növényi szövetek membránjainak fiziko-kémiai jellemzői erősen változnak a természetes kiszáradás folyamán, így a DNS óriásmolekulák is bejuthatnak a növényi sejtekbe (Ledaux és Huart, 1969).

Pollentömlő eljárás. Duan és Chen (1985) használta először a módszer egyszerű változatát, amikor egy bíbor színű rizsfajta teljes genomikus DNS-kivonatát egy közönséges rizsfajta virágzatába juttatták úgy, hogy a befogadó virág bibeszálát felénél elvágva a vágott felületre cseppentettek egy kis mennyiségű DNS oldatot. Az eljárást azóta tovább fejlesztették, azonban a transzformációs hatékonysága igen alacsony, ezért alig használatos.

Mikrotűk alkalmazása során a tenyésztett növényi sejteket folyékony táptalajban, szilikon-karbid mikrotűk és plazmid-DNS jelenlétében rázatják. Az eljárás során a mikroméretű szilikonkarbid tűk befúródtak a sejtekbe, és magukkal vitték az oldatban lévő DNS molekulákat (Jenes, 1999).

Génbelövéses módszer a növényekbe történő génbevitel egyik legújabb megközelítése. A „génbelövés” kifejezés a módszer lényegére utal, miszerint a DNS élő sejtekbe, szövetekbe történő juttatása egy génbelövő készülékkel („génpuskával”) történik. Az eljárás lényege, hogy a DNS molekulákat hordozó mikrolövedékeket (wolfram vagy arany részecskéket) nagy sebességre gyorsítják fel, így a részecskék áthatolnak a sejtfalon és a sejtmembránon, magukkal szállítva a sejtek belsejébe az idegen DNS-molekulákat. A sejtek egy része túléli az így okozott sérülést, osztódik és ezekből a sejtekből megfelelő szelekciós körülmények között növények regenerálhatók.

Az **indirekt génbeviteli** rendszereknél az idegen DNS bejutását egy közvetítő organizmus segítségével érjük el. A két legismertebb módszer:

Virális vektor alkalmazása DNS bevitelre, elsősorban a kétszálú (Caulimovírusok) és egyszálú (Gemini vírusok) DNS-vírusok kerültek alkalmazásra. Valamint *Agrobacterium* fajok vektorként történő felhasználásával működő rendszerek.

3.7. *Agrobacterium* közvetítette növénytranszformáció

Ezen eljárások elsősorban a kétszálú növényfajok körében alkalmazhatóak (Jenes, 1999). Az *Agrobacterium* fajok rendelkeznek azzal a képességgel, hogy a növényi genomba géneket juttassanak. A *Rhizobiaceae* családba tartozó Gram-negatív *Agrobacterium tumefaciens* és az *Agrobacterium rhizogenes* talajbaktériumok a kétszálú növényeket sebzési helyeken fertőzik. A fertőzött növényeken tumorok kifejlődését, illetve hajszálgyökeresedést okoznak (Folk és Glits, 1993).

A tumorszövetek az egészséges növényi szövetekkel szemben *in vitro* növekedésszabályozó anyag mentes táptalajon növekedésre képesek és opinokat termelnek. A tumorképződésért és az opinszintézisért az *Agrobacterium* sejtekben található Ti-plazmid a felelős (Zaenen et al., 1974). Az opinok a baktérium számára felhasználhatók a növény számára azonban nem. Molekuláris hibridizációval igazolták, hogy a Ti-plazmid egy része, az úgynevezett transzfer vagy T-DNS a baktériumfertőzés során átkerül a növényi sejtekbe, és stabilan integrálódik a sejtmag DNS-ébe. A T-DNS régió átjuttatásához szükséges virulencia gének (*vir*) nem a T-DNS-en, hanem azon kívül helyezkednek el (Bisztray, 2001). A T-DNS mintegy 20 kbp hosszúságú, két rövid, 25 bázispár hosszúságú ismétlődő határszekvencia veszi körül. A két szakasz közötti gének nem befolyásolják a fertőzőképességet, a virulenciát, a génátvitelt és az integrációt, így ezek a részek kicserélhetők más DNS szakaszokra is, melyek akár 50 kbp hosszúságúak is lehetnek (Miranda et al., 1992). A határszekvenciák közé épített idegen DNS szakasz a baktériumos fertőzés folyamán a T-DNS-sel együtt kivágódik, átkerül a növényi sejtbe, majd integrálódik a sejtmagi DNS-be. Mivel a tumoros fenotípusért felelős növekedésszabályozó anyag gének nem szükségesek a fertőzési és átviteli folyamatokhoz, azokat génsebészeti módszerekkel eltávolították, és az így nyert, úgynevezett legyengített átalakított vektorok már használhatók transzformáns növények létrehozására.

3.8. A sárgadinnye transzformáció módszerei

Az idegen gént hordozó, úgynevezett transzgénikus növény előállításához általában szükség van a testi sejtekből történő hajtás indukcióra (Dudits és Heszy 2000). Tehát a sikeres transzformációhoz rendelkezésre kell állnia egy működő és hatékony regenerációs rendszernek. A sárgadinnye sikeres transzformációja ma már jelentős gazdasági előnyökkel is jár a nemesítők számára, ugyanis az új fajták iránt érdeklődő vetőmag előállító cégek számára növeli a fajta értéket, ha lehetőség van az adott fajta transzgénikus technológiával történő célzott továbbfejlesztésre. Sikeres transzformációról magyar fajta esetében még nem számoltak be, külföldi fajtáknál a szakirodalomban leírt eredményeket a 3. táblázat foglalja össze.

3. táblázat Áttekintés a sikeres sárgadinnye transzformációs eljárásokról (A rövidítések jegyzékében (1. fejezet) megtalálhatóak a táblázatban szereplő rövidítések)

Felhasznált fajták	Reg. táptalaj (mg/l)	Transzformáció módja	Felhasznált gének	Eredmények	Hivatkozás
Hale' Best Jumbo	IES (0.88), BA (1.13), ABS (0.26)	<i>A. tumefaciens</i> LBA4404 törzs	NPT II	regenerált transzformáns növény	Fang és Grumet, 1990
Orient sweet (F1 hibrid)	BA (0.5)	<i>A. tumefaciens</i> GV311SE törzs A208SE törzs	NPT II, DHFR, GUS luciferáz gén	regenerált transzformáns növény	Dong et al., 1991
Prince	BA (1)	<i>A. tumefaciens</i> LBA4404 törzs	CMV köpenyfehérje	regenerált rezisztens növény	Yoshioka et al., 1992
Galia	BA (1)	Génpuska	GUS	regenerált transzformáns növény	Gaba et al., 1992
Hale' Best Jumbo	IES (0.88), BA (1.13), ABS (0.26)	<i>A. tumefaciens</i> LBA4404 törzs	ZYMV köpenyfehérje	regenerált rezisztens növény	Fang és Grumet, 1993
Bupree Hybrid Hale's Best Jumbo Harvest Queen Hearts of Gold Topmark	BA (1)	<i>A. tumefaciens</i> C58Z707 törzs	CMV köpenyfehérje	regenerált részben rezisztens növény	Gonsalves et al., 1994b
Amarillo Oro	IES (1.5), KIN (6)	<i>A. tumefaciens</i> LBA4404 törzs	NOS/NPT II, GUS	regenerált transzformáns növény	Vallés és Lasa, 1994
Edem Gem	2,4-D (5), TDZ (0.1)	<i>A. tumefaciens</i> Génpuska	NPTII	regenerált transzformáns növény	Gray et al., 1995
Tezier 10	IES (0.88), BA (1.13)	<i>A. tumefaciens</i> LBA4404 törzs	CMV köpenyfehérje	regenerált transzformáns növény	De Both et al., 1995
Védrantais (Cantaloup)	NES (0.1), BA (0.5)	<i>A. tumefaciens</i> LBA4404 törzs	antiszensz ACC oxidáz (dinnyéből)	etilén szintézisében gátolt növény	Ayub et al., 1996

Felhasznált fajták	Reg. táptalaj (mg/l)	Transzformáció módja	Felhasznált gének	Eredmények	Hivatkozás
Pharo, Amarillo Canario	IES (1.5), KIN (6)	<i>A. tumefaciens</i> LBA4404 törzs	HAL1, NPT II, GUS	regenerált sótűrő növények	Bordas et al., 1997
Hale's Best Jumbo	IES (0.9), BA (0.6), ABS (0.25)	<i>A. tumefaciens</i> LBA4404 törzs	BAR, GUS	regenerált herbicid rezisztens növények	Qiu et al., 1999
Pharao	IES (1.5), KIN (6)	<i>A. tumefaciens</i>	HAL1, TPS1	regenerált só- illetve szárazságtűrő növények	Serrano et al., 1999
Védrantais (Cantaloup)	BA (0.225) 2iP (0.2)	<i>A. tumefaciens</i> LBA4404 törzs	NOS/NPT II, antiszensz ACC oxidáz (dinnyéből)	etilén szintézisében gátolt diploid növény	Guis et al., 2000
Gaúcho	BA (0.93) vagy BA (0.225) 2iP (0.2)	<i>A. tumefaciens</i> LBA4404 törzs	NPT II, antiszensz ACC oxidáz (almából)	etilén szintézisében csökkent növény	Nora et al., 2001
Arava	cseresepes növények sziklevelét kezelték	kézi génpuska, ZYMV potyvírus vektor	BAR	herbicid rezisztens növények	Shiboleth et al., 2001
BU-21/3	BA (1)	<i>A. tumefaciens</i> LBA4404 törzs	GUS/GFP	regenerált transzformáns növény	Galperin et al., 2003b
Earl's Favourite Fuyu	2,4-D (2), BA (0.1)	<i>A. tumefaciens</i> LBA4404 törzs	NPT II, GUS	regenerált transzformáns növény	Akasaka-Kennedy et al., 2004
Kirkagac 637	IES (0.9), BA (1.1), ABS (0.26)	<i>A. tumefaciens</i> LBA4404 törzs	NPT II, ZYMV köpenyfehérje	regenerált rezisztens növény, az utód nemzedékekben is	Yalcin-Mendi et al., 2004
Védrantais (Cantaloup)	n.a.	<i>A. tumefaciens</i> LBA4404 törzs	antiszensz ACC oxidáz (almából)	etilén szintézisében gátolt növény	Silva et al. 2004
Védrantais Earl Favourite Fuyu A	2,4-D (2), BA (0.1)	<i>A. tumefaciens</i> C58C1Rif [®] törzs	NPT II, GUS	regenerált transzformáns növény	Akasaka-Kennedy et al., 2004
BU21/3	BA (1)	<i>A. tumefaciens</i> LBA4404 törzs EHA105 törzs	AT1, AT2	peronoszpórával szemben rezisztens növény	Taler et al., 2004
Kirkagac 637 és Noi Yarak	IES (0.88), BA (1.13), ABS (0.26)	<i>A. tumefaciens</i> EHA105 törzs	NPT II, BAR, GUS	regenerált herbicid rezisztens növények	Curuk et al., 2005
Galia	BA (1) NES (0.001)	<i>A. tumefaciens</i> ABI törzs	antiszensz ACC oxidáz	etilén szintézisében gátolt növény	Nunez-Palenius et al., 2006
Galia	BA (1) NES (0.001)	<i>A. tumefaciens</i> ABI törzs	antiszensz ACC oxidáz/GUS	etilén szintézisében gátolt növény	Nunez-Palenius et al., 2007
Cantalup	BA (1.2) NES (0.1),	<i>A. tumefaciens</i> EHA105	rabies vírus glikoprotein fehérje gén (PRGSpRgp)	transzformáns növ. által termelt fehérjével vakcinált egerek	Nagesha et al., 2007
Silver light	NES (0.02), BA (0.5)	<i>A. tumefaciens</i> LBA4404 törzs	NPT II, ZYMV köpenyfehérje	regenerált transzformáns növény	Wu et al. 2009

Az itt felsorolt sikeres transzformációk során a felhasznált növényi forrás a legtöbb esetben különböző korú (2, 4, 5, 6, 7 napos) szikleveél volt, kivéve négy esetet, ahol levélből (8, 10, ill. 14 napos) (Bordas et al., 1997; Serrano et al. 1999; Guis et al., 2000; Nora et al., 2001) is sikeres transzformációt hajtottak végre, azonban kisebb hatékonysággal. A regenerációs táptalajok Murashige és Skoog (1962) által leírt táptalaj összetételűek voltak. A már bevált regenerációs technikák közül csak néhányat alkalmaztak. Három sikeres transzformációhoz is az 0.88 mg/l indolecetsavat, 1.13 mg/l benziladenint és 0.26 mg/l abszcizinsavat tartalmazó táptalajt alkalmazták, Fang és Grumet (1990) kísérletei alapján. Qiu és munkatársai (1999) ugyanezeket a növekedésszabályozó anyagokat használták, de eltérő összetételben. Bordas és munkatársai (1997) a Hógolyó fajtával egy fajtacsoportba tartozó Amarillo Oro fajtára kidolgozott táptalaj összetételt (Moreno et al., 1985) használták két másik fajta (Pharo, Amarillo Canario) transzformációjára. A transzformációhoz általában az *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 törzset használták, de három esetben génpuskát alkalmaztak. Az irodalomban jelenleg nem található adat, hogy a sárgadinnye transzformációja során *A. rhizogenes* törzset használtak volna. Gaba és munkatársai (1992) génpuskát alkalmazva organogenezis útján jutottak transzformáns növényekhez. Gray és munkatársai (1995) ugyanezt a módszert alkalmazva szomatikus embriogenezis útján regeneráltattak transzformáns növényeket. Gray és munkatársai (1995) azt figyelték meg, hogy a génpuskával transzformált növények normálisan fejlődtek, míg az *Agrobacterium*mal fertőzött regenerálódó embriók között sok deformált volt. A legtöbb szerző megállapította, hogy a transzformáció sikeressége, akár *Agrobacterium* közvetített, akár génpuska által történik, mindenképpen a használt genotípustól, kiindulási anyag kiválasztásától és táptalaj összetételétől erősen függ (Fang és Grumet, 1990; Dong et al., 1991; Yoshioka et al., 1992; Gonsalves et al., 1994; Vallés és Lasa, 1994; Gray et al., 1995; Bordas et al., 1997; Akasaka-Kennedy et al. 2004). Fang és Grumet (1990) több tényezőt is megvizsgált, mint például a kanamicin koncentrációt, az *Agrobacterium* szuszpenzió koncentrációját, a fertőzés idejét, a kokultiváció hosszát. Végül megállapította, hogy szelekciós antibiotikumként 75 mg/l kanamicin, egy éjszakán át rázatott 10^7 - 10^8 baktérium/ml koncentrációjú ($OD_{600}=0.8$) *Agrobacterium* szuszpenzió, a sziklevelek tíz perces fertőzése, 3 napos kokultivációs időtartam szükséges a leghatékonyabb transzformációhoz. Szelekciós markerként legtöbbször kanamicin rezisztenciát alkalmaztak. Az *Agrobacterium* elölésére leggyakrabban a cefotaxim és carbenicillin antibiotikumokat használták. A legtöbb sárgadinnyére kidolgozott genetikai transzformációs módszer hatékonysága más növényfajokhoz képest alacsonyabb (Fang és

Grumet, 1990; Dong et al., 1991; Gaba et al., 1992; Bordas et al., 1997; Akasaka-Kennedy et al., 2004). A transzformáció hatékonysága persze több tényező is befolyásolta ezért eléggé eltérő adatok születtek. Ezek közül csak azokat soroltuk fel, amelyek összehasonlítható adatokat közöltek. Fang és Grumet (1990) 3-7%-os hatékonyságot állapított meg. Dong és munkatársai (1991) hasonló eredményekről számoltak be (4-6%). Gaba és munkatársai mindösszesen 1%-os hatékonysággal transzformáltak, de ennél gyengébb eredmények születtek Gonsalves és munkatársai (1994b) kísérletei során, ahol nem mindig volt sikeres a transzformáció (0-1%). Bordas és munkatársainak (1997) 0.7-3% közötti hatékonyságot sikerült elérniük, csak úgy mint Guis és munkatársainak (2000), akik hasonló hatékonyságot értek el (2.4%). A leghatékonyabb transzformációt Nunez-Palenius és munkatársai (2006) írták le. Az első Uborka mozaik vírussal (CMV) szemben rezisztens sárgadinnye növényt Yoshioka és munkatársai (1992) hozták létre. Bordas és munkatársai (1997) pedig elsőként állítottak elő sótűrő növényeket, az élesztőből izolált sótűrés gén (HAL1) segítségével. Serrano és munkatársai (1999) a sótűrő növények felnevelése mellett szárazsággal szemben ellenálló növényeket is előállítottak szintén élesztőből izolált szárazságtűrés gén (TPS1) transzformálásával. A következő hasznos gén, amelyet a dinnye transzformációk során alkalmaztak az ACC oxidáz gén volt. Először Ayub és munkatársai (1996) dinnyéből izolált ACC oxidáz gént antiszensz irányultsággal jutattak a Védrañtais sárgadinnye fajtába. Ennek hatására a sárgadinnye termés érésekor lecsökkent az etilén szintézise.

3.9. A tökfélék transzformációs módszerei

A *Cucurbitaceae* családban a kezdeti kísérletekben különösen a *Cucurbita pepo* fajták bizonyultak a kabakosok közül jó regenerációs képességűeknek, ezért a transzformációs kísérletek is elsősorban ezekre a sikerrel kecsegtető fajtákra irányultak. Az irodalomban azonban nagyon kevés információ áll rendelkezésre a transzformációs kísérletek kivitelezéséről. A jelenleg hozzáférhető publikációk többsége már a szántóföldi összehasonlító kísérletekkel foglalkozik és a transzformációs módszert nem írja le részletesen. A génátvitel szinte minden esetben *Agrobacterium tumefaciens* törzsekkel történt, de eredményes próbálkozások történtek az *Agrobacterium rhizogenes* felhasználására is (Katavic et al., 1991; Toppi et al., 1997).

Katavic és munkatársai (1991) *C. pepo* 6-8 napos sziklelevelét megfertőzték egy vad típusú (*A. rhizogenes*) törzsszel (8196). Hormonmentes táptalajon gyökérszőrök jelentek meg a sziklevek sebzési felületén, míg a kontrol növényeken nem történt gyökér képződés. Az izoenzim vizsgálat magas peroxidáz enzim aktivitást mutatott a transzgénikus gyökerekben.

Chee (1997) transzformációs kísérletei során a regenerációs kísérleteiben már többször használt YC 60 tök fajta hajtásmerisztéma eredetű embriogén kalluszát fertőzte *A. tumefaciens* C58Z707 törzsszel. A fertőzést követően négy napos együttenyészés után a baktérium elöléséhez 500 µg/ml carbenicillint használt, szelekciós tényezőként 100-200 µg/ml kanamicint alkalmazott. A baktérium túlnövekedése miatt annak elölésére a későbbiekben 500 mg/l carbenicillint tartalmazó folyékony MS táptalajban leöblítette a szöveteket. Chee (1997) ebben a munkájában még leírt egy génbelövéses módszert is és további javaslatokat tett herbicid tűrés vagy rovarokkal, gombákkal szembeni rezisztencia kialakítására.

Gyakran egy fajta többféle vírus elleni rezisztencia gént is sikerült bejuttatni, így beszámoltak ZYMV- és WMV 2- rezisztens fajták (Quemada, 1998), CMV-, WMV 2- és ZYMV-rezisztens fajták (Tricoli et al., 1995) és SqMV-rezisztens fajták (Pang et al., 2000) előállításáról is. A rezisztencia kialakítását minden esetben köpenyfehérje gén bejuttatásával érték el.

Az új, genetikailag módosított fajták többségét már üvegházi vagy szántóföldi körülmények között is vizsgálták. Ehhez többnyire összehasonlító vizsgálatokat végeztek a transzformáns és a nem - transzformáns növények között (Rowell et al., 1999; Gonsalves et al., 1994a; Arche-Ochoa et al., 1995; Quemada, 1994), de vizsgálták a transzformáns növények hatását a környezetre is (Fuchs et al., 1998). Néhány esetben az új fajtákat élelmezés egészségügyi szempontból is analizálták (Quemada, 1996), ebben az esetben a termés beltartalmi értékei mellett az esetleges allergia keltő hatását, toxicitását is ellenőrizték. Ilyen transzformáns fajta például a ZW 20, amelyet többen is sikeresen teszteltek szabadföldi kísérleteik során (Quemada, 1998; Fuchs és Gonsalves, 1995).

Gaba és munkatársai (2004) megerősítették azt a feltételezésünket, hogy a tök esetében is a regenerációs képesség erősen genotípus függő, így a már kidolgozott módszerek nem minden esetben voltak alkalmazhatóak. Az eddig publikált transzformációk minden esetben külföldi fajtákon történtek, ezért fontosnak éreztük, hogy olyan jól működő rendszert dolgozzunk ki, amellyel magyar fajták is hatékonyan transzformálhatók.

4. ANYAG ÉS MÓDSZER

4.1. Felhasznált anyagok

4.1.1. Növények

4.1.1.1. Sárgadinnye fajták

A Magyarországon termesztett sárgadinnye fajtákat a szakirodalom eléggé önkényesen csoportosítja. Ez a csoportosítás egy szűk körre korlátozódik, amely ma már nem tudja átfogni a termesztésben lévő fajtákat sem, még kevésbé ad eligazítást a külföldi fajták értékelésére. Sokkal nagyobb jelentősége van a termesztés szempontjából a gyakorlati csoportosításoknak. Ezek fő szempontként azokat a külső morfológiai bélyegeket veszik alapul, amelyek szerint a piacon a fogyasztók a dinnyét vásárolják.

Európában három fajtatípus: a *cantalupensis* (kantalupe; Cantalupo – Róma külvárosa); *reticulatus* (a recés termésmintázat után) és az *inodorus* (ízetlen, nem aromás, téli dinnyék) típusú fajtáknak van gazdasági jelentősége (Horváth et al., 2007).

Kísérleteink során nyolcféle magyar, illetve egy amerikai sárgadinnye fajtával foglalkoztunk. A felhasznált sárgadinnye magokat a Hógolyó és a Hale's Best fajta kivételével az OMMI kísérleti anyagából, Dr. Szani Szilárdtól kaptuk. A Hógolyó fajta magját a fajtafenntartótól (Zöldségtermesztési Kutató Intézet Zrt.) szereztük be, míg a Hale's Best fajtát a Budapesti Corvinus Egyetem Genetika és Növénynemesítés Tanszékének kísérleti anyagából kaptuk. A folyékony táptalajon történő regenerációs kísérletekhez használt fajták magvait szintén a Budapesti Corvinus Egyetem Genetika és Növénynemesítés Tanszékének kísérleti anyagából kaptuk. A fajták magvai előzetes tesztelés alapján 90% feletti csírázóképeséget mutattak. A felhasznált fajták rövid jellemzését az alábbi táblázatba gyűjtöttem össze (**4. táblázat**).

4. táblázat A felhasznált fajták fontosabb jellemzői (Balázs, 1994, Szabó et al., 2005)

Fajta neve	Fajtacsoport	Növekedés típusa	Tenyészedő	A termés	
				Alakja	Hússzíne
Muskotály	<i>cantalupensis</i>	erős főhajtás, közepes oldalhajtás	középhosszú	gömb, lapított gömb, gerezdes	halványzöld
Ezüstananász	<i>cantalupensis</i>	középerős, erős	rövid	lapított gömb, bordás	narancssárga
Javított Zentai	<i>cantalupensis</i>	középerős	igen rövid	lapított gömb	világossárga
Topáz	<i>cantalupensis</i>	középerős	rövid	lapított gömb	világoszöld
Hógolyó	<i>inodorus</i>	erős	hosszú	gömbölyű	fehéres-zöld
Tétényi csereshéjú	<i>reticulatus</i>	középerős	középkorai	gömbölyű, enyhén gerezdes	narancssárga
Magyar kincs	<i>reticulatus</i>	középerős	középkorai	gömbölyű	halványzöld
Fortuna	<i>reticulatus</i>	erős	középérésű	gömb, gyengén gerezdes	halványzöld
Hale's Best	<i>reticulatus</i>	középerős	korai	ovális	narancssárga

4.1.1.2. Tök fajták

A felhasznált magokat a Budapesti Corvinus Egyetem Genetika és Kertészeti Növénynevelés Tanszékének kísérleti anyagából kaptuk. A kísérleteket az alábbi növényekkel végeztük:

Cucurbita pepo convar. *patissoniana* 'Óvári fehér' (patisszon): Szára közepesen serteszőrös, az ízközök hossza 5-10 cm. Indái 2-3 m-re is elkúsznak. Levele nagy, 3-5 karéjos, fogazott. A termés félgömb vagy lapított gömb alakú, tompán fogazott. Ezt az alakot a termés a biológiai érettség állapotában is megtartja. A fogyasztásra érett termés héjszíne fehér, fehéres halványzöld, héja puha, a magok fejletlenek. A hús színe fehér zöldes árnyalattal (Kapás, 1986).

Cucurbita pepo convar. *giromontiina* 'Black Beauty' (cukkíni): Rövid tenyészidejű, indátlan guggon ülő típus, amely szabadföldi termesztésre kiválóan alkalmas. Biztonságosan termő, nagy hozamú fajta. Zsenge gyümölcse fénylő világos, majd sötétzöld, éretten feketés sötétzöld színű, fénytelen, hosszában enyhén bordázott felületű.

Cucurbita maxima convar. *maxima* 'Nagydobosi' (sütőtök): Szabadföldi termesztésre alkalmas, középerős-erős hajtásrendszert fejlesztő fajta. Termése lapított gömb, héja világosszürke, húsa narancssárga, magas a cukortartalma. A termések átlagtömege 4-8 kg. Tárolásra és tartósítóiipari felhasználásra alkalmas (Nagy, 1997).

4.1.2. Növényi táptalajok, növekedésszabályozó anyagok

4.1.2.1. Szilárd táptalajok és növekedésszabályozó anyag összetételük sárgadinnye esetében

Többféle táptalajt és többféle növekedésszabályozó anyag kombinációt teszteltünk, alaptáptalajként minden esetben Murashige és Skoog táptalajt alkalmazva (**5. táblázat**). A táptalajok pH értékét káliumhidroxiddal illetve citromsavval állítottuk be 5.6 – 5.8 közötti értékre. Szilárdító közegként 8 g/l agart vagy 2.5 g/l phytagelt alkalmaztunk.

5. táblázat Murashige és Skoog táptalaj (Murashige, 1962)

Makroelemek		Mikroelemek		Vitaminok	
CaCl ₂	332.02 mg/l	CoCl ₂ × 6H ₂ O	0.025 mg/l	Glicin	2 mg/l
KH ₂ PO ₄	170 mg/l	CuSO ₄ × 5H ₂ O	0.025 mg/l	Inozit	100 mg/l
KNO ₃	1900 mg/l	FeNa EDTA	36.7 mg/l	Nikotinsav	0.5 mg/l
MgSO ₄	180.54 mg/l	H ₃ BO ₃	6.2 mg/l	Pirimidoxin HCl	0.5 mg/l
NH ₄ NO ₃	1650 mg/l	KI	0.83 mg/l	Tiamin HCl	0.1 mg/l
		MnSO ₄ × H ₂ O	16.9 mg/l		
		Na ₂ MoO ₄ × 2H ₂ O	0.25 mg/l		
		ZnSO ₄ × 7H ₂ O	8.6 mg/l		

Előkísérleteink során a Magyar kincs, a Javított Zentai, Hógolyó és a Tétényi Csereshéjú sárgadinnye fajtákat vizsgáltuk, az MD1, MD2 és MD3 táptalajokon (**6. táblázat**). Ezeken felül a Hógolyó fajtát további vizsgálatoknak vetettünk alá az MD4 és MD5 táptalajokon.

6. táblázat A sárgadinnyénél használt regenerációs táptalajok növekedésszabályozó anyag összetétele agarral szilárdított MS alaptáptalaj esetében (A táblázaton belül a zárójelben lévő értékek a növekedésszabályozó anyag koncentrációt jelentik)

Elnevezés	Regenerációs táptalajok növ. szab. anyag összetétele (mg/l)	Hivatkozás
MD1	MS + indolecetsav (1.5), kinetin (6)	Moreno et al., 1985
MD2	MS + 2.4-D (1), benziladenin (0.1)	Branchard et al. 1988a
MD3	MS + naftilecetsav (0.1), benziladenin (0.5)	Roustan et al., 1992
MD4	MS + indolecetsav (0.88), benziladenin (1.13), abszcizinsav (0.26)	Niedz et al., 1989
MD5	MS + indolecetsav (2.4) benziladenin (2.5)	Bársony et al., 1999

Az előkísérletek után kilenc fajta regenerációs képességét teszteltem további öt, phytagellel szilárdított táptalajon (**7. táblázat**). Ebben az esetben minden fajtát mind az ötféle táptalajon vizsgáltam.

7. táblázat A szilárd táptalajok növekedésszabályozó anyag összetétele kilenc sárgadinnye fajta esetében. (A táblázaton belül a zárójelben lévő értékek a növekedésszabályozó anyag koncentrációt jelentik)

Elnevezés	Regenerációs táptalajok növekedésszabályozó anyag összetétele (mg/l)
MD6	MS + benziladenin (0.5), indolecetsav (1), abszcizinsav(0.26)
MD7	MS + benziladenin (0.5), naftilecetsav (1)
MD8	MS + benziladenin (0.5), 2,4-D (1)
MD9	MS + benziladenin (0.5),
MD10	MS + benziladenin (1)

4.1.2.2. Folyékony táptalajok és növekedésszabályozó anyag összetételük sárgadinnye esetében

A szomatikus embriogenezishez kétféle táptalajt alkalmaztunk: egy folyékony indukciós táptalajt, amely az embriók kialakulását váltotta ki a növényanyagból, aztán pedig egy növekedést serkentő szilárd táptalajt az embriók továbbfejlődéséhez. Az alaptáptalaj a 4.1.2.1 fejezetben leírt MS táptalaj volt.

Vizsgálataink során az alaptáptalaj növekedésszabályozó anyag összetételét több kombinációban vizsgáltuk, továbbá megváltoztattuk a folyékony táptalaj pH értékét, vitamin tartalmát illetve szénforrását. Indukciós táptalajok esetében két különböző pH értéket vizsgáltunk (pH 5.4 és 4.6). Vitaminok esetében az MS vitaminok mennyiségét változtattuk (normál, illetve kétszeres mennyiségben alkalmazva), illetve kipróbálásra került a B5 vitamin (pantoténsav) is. A táptalajokban szénforrásként glükózt, szacharózt és maltózt használtunk. A növekedésszabályozó anyagok közül a 2,4-D (0-10 mg/l) és a BA (0-1 mg/l) különböző koncentrációit teszteltük.

A szilárd táptalajként minden esetben növekedésszabályozó anyag mentes MS táptalajt használtunk, 30 g/l szacharóz szénforrással. Szilárdító anyagként agart (Oxoid) használtunk háromféle koncentrációban (0.5, 1 és 2%).

A táptalaj összetevőket vizsgálva az egyik kísérletben hat különböző táptalajt teszteltünk. A táptalajok között a különbség a vitamin és szénforrás tartalmukban, illetve az indításkor beállított pH értékükben volt. A táptalajok a normál MS mikro- és makroelemeken felül 0.1 mg/l BA és 2 mg/l 2,4-D növekedésszabályozó anyagot tartalmaztak. **(8. táblázat)**

8. táblázat A sárgadinnye regenerációs kísérletekben vizsgált folyékony indukciós táptalajok pH értéke, cukor- és vitamin tartalma

táptalaj neve	szénforrás	pH (főzés után)	vitamin
MD11	30 g/l szacharóz	5,4	dupla MS
MD12	30 g/l szacharóz	5,4	normál MS
MD13	30 g/l szacharóz	4,6	dupla MS
MD14	30 g/l glükóz	4,6	normál MS
MD15	30 g/l glükóz	4,6	0,5 mg/l pantoténsav
MD16	10 g/l szacharóz, 10 g/l glükóz, 10 g/l maltóz	4,6	normál MS

A Muskotály és a Hógolyó fajtát mind a hat táptalajon vizsgáltuk, az Ezüstananász fajtát azonban csak az MD11 és MD13 táptalajon. A kísérletben kezelésenként 6 ismétlést végeztünk, majd a jó válaszadó képességű fajtáknál további tenyészeteket is indítottunk. A kísérlet során az egyes folyadékkultúrában indított tenyészetekből különböző időpontokban (az indítástól számított 28, 35, 43, 50 nap után) történt szélesztés szilárd növekedésszabályozó anyag mentes MS táptalajra. Egy-egy alkalommal mindig a már felismerhető, fejlett embriókat (esetleg növénykéket) valamint bezöldült magdarab részeket (3-4 darab) emeltünk ki. Az apró és korai stádiumban levő embriókat tartalmazó szuszpenziót tovább rázattuk a bennmaradó magdarabokkal együtt. A folyékony kultúrából növekedésszabályozó anyag mentes szilárd MS táptalajra passzált mintákat a többhetes továbbnevelés után a növényszám alapján értékeltük. A legalább két-három leveles, gyökeres növényeket számoltuk össze.

4.1.2.3. Szilárd táptalajok tökfélék esetében

A tök regenerációs kísérletek során különböző növekedésszabályozó anyag kombinációkat teszteltünk (**9. táblázat**), hogy megtaláljuk az optimális összetételt az általunk használt fajtákhoz. A táptalajok pH-ját káliumhidroxiddal, illetve citromsavval állítottuk be a kívánt 5.7-5.9-es értékre.

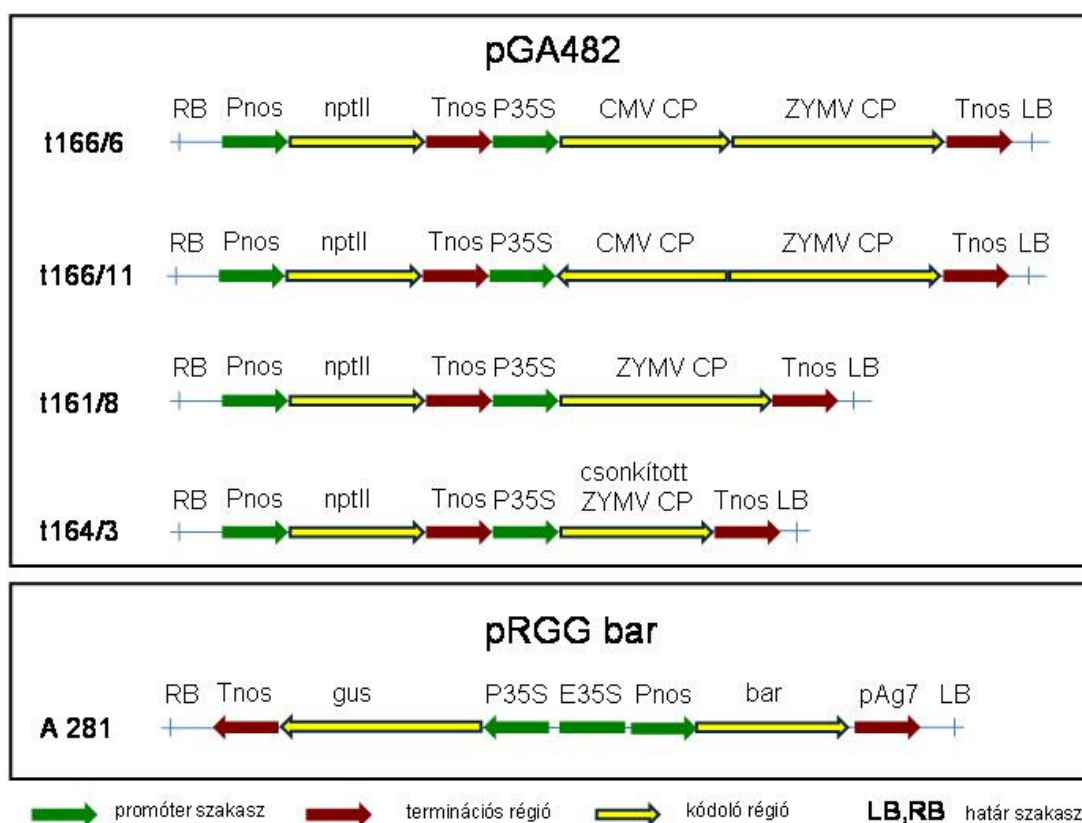
9. táblázat A tök regenerációs táptalajok növekedésszabályozó anyag összetétele:

Táptalaj elnevezése	Regenerációs táptalajok növ. szab. anyag összetétele (mg/l)
MT1	MS +2.4-D (4)
MT2	MS +2.4-D (3)
MT3	MS +2.4-D (2), kinetin (5)
MT4	MS +2.4-D (1), kinetin (0.5)
MT5	MS +indolecetsav(0.9), benziladenin(1), abszcizinsav(0.26)
MT6	MS +indolecetsav(1), benziladenin(1.2)
MT7	MS +indolecetsav(1.2), benziladenin(1)

A táptalajokat mindhárom fajtánál kipróbáltuk. A legígéretesebb kombinációval ugyancsak mindhárom fajtára egy optimalizáló kísérletet is elvégeztünk, melyhez indolecetsavat 0-0.9 mg/l és benziladenint 0-1.2 mg/l közti koncentrációkban használtunk, összesen huszonötféle kombinációt kipróbálva. A megjelent 2 - 3 leveles hajtásokat 0.5 mg/l indolecetsavat tartalmazó táptalajon gyökerezettük.

4.1.3. Felhasznált baktériumtörzsek és plazmidok

A transzformációhoz kétféle *Agrobacterium tumefaciens* törzset használtunk. Az A281 törzset (pRGG bar plazmid) Dr. Nagy István, a Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont, (MBK, Gödöllő) munkatársa, az LBA4404 törzset (pGA482 plazmid) pedig Dr. Tóbiás István, az MTA Növényvédelmi Kutatóintézetének (Budapest) munkatársa bocsátotta rendelkezésünkre. Az A281 törzs a BAR gént hordozta (glufozinát herbicidekkel szembeni toleranciát okozó gén). A LBA4404 törzs pGA482 plazmidja (1. ábra) növényi szelekciós markerként NOP (nopalin szintetáz) gén promoterével meghajtott kanamicin rezisztencia gént (*nptII*) hordoz. Hasznos génként az Uborka mozaik vírus köpenyfehérje (CMV CP) és/vagy a Cukkíni sárga mozaik vírus köpenyfehérje (ZYMV CP) génjét tartalmazza. A t166/6 konstrukció CMV és ZYMV köpenyfehérje gének fúziós termékét expresszálja. A t166/11 konstrukció az előbbtől eltérően a CMV köpenyfehérjét antiszensz orientációban tartalmazza. A t161/8 csak a ZYMV köpenyfehérjét, míg a t164/3 konstrukció ennek csonkolt változatát hordozza. A gének működését karfiol mozaik vírus (CaMV) 35S promoter szekvenciája irányítja, mindkét törzs esetében. A baktériumokat YEP, illetve LB táptalajokon tenyésztettük (**10. táblázat** és **11. táblázat**).



1. ábra A pGA482 és pRGGbar plazmid felépítése [nos: nopalín-szintáz gén, nptII= neomycín-foszfo-transzferáz gén, P35S: karfiol mozaikvírus promóter E35S karfiol mozaikvírus enhancer, CMV CP: Uborka mozaik vírus köpenyfehérje, ZYMV CP: Cukkíni sárga mozaik vírus köpenyfehérje, gus (uidA) = β -glükuronidáz gén, bar: glufoszínát herbicidekkel szembeni toleranciát okozó gén, pAg7: 7 gén poliadenilációs jel (Mihalka et al., 2000; valamint Tóbiás és Palkovics, 2003 alapján)]

10. táblázat Az LBA4404 törzs tenyésztéséhez alkalmazott szelekciós táptalaj (Tavazza et al. 1988)

YEP táptalaj összetevői	koncentráció (g/l)
Agar	15
Yeast extract	10
Pepton	10
NaCl	5
kanamicin	0.025

11. táblázat Az A281 törzs tenyésztéséhez alkalmazott szelekciós táptalaj (Miller, 1987)

LB táptalaj összetevői	koncentráció (g/l)
Trypton	10
Yeast extract	5
NaCl	5
Agar	10
kanamicin	0.025

4.2. Alkalmazott módszerek

4.2.1. Fertőtlenítési módszerek

Sárgadinnye szilárd táptalajon

Többféle fertőtlenítési módszer hatékonyságát vizsgáltuk. Eleinte a magokat maghéjjal együtt próbáltuk meg fertőtleníteni. A későbbiekben a magok fertőtlenítése előtt a maghéjat még száraz állapotban eltávolítottuk.

12. táblázat Az általunk alkalmazott fertőtlenítési módszerek

Fertőtlenítőszer	Koncentráció	Sterilizálási idő	Öblítés	Hivatkozás
Clorox	15 %	10, 15, 20, 30 perc	3x steril deszt. víz	Yadav, 1996
Etil-alkohol utána nátrium-hipoklorit (NaOCl)	70 % utána 2,5 %	30 másodperc utána 10, 15, 20, 30 perc	4x steril deszt. víz	Ficcadenti és Rotino, 1995
Hidrogénperoxid (H ₂ O ₂)	10 %	10, 15, 20, 30 perc	3x steril deszt. víz	Bársony, 1999

Fertőtlenítés után a magokat steril papíron megszáritottuk, majd növekedésszabályozó anyag mentes MS táptalajra vetettük 8 g agart vagy 2.5 g phytigel-t használva szilárdító anyagként egy liter táptalajhoz. A vetéshez 200 ml-es üvegeket használtunk, melyekbe 30 ml táptalajt tettünk, amit a kiöntés után sterilizáltunk, 15 percig 120 °C-on, 1 bar nyomáson. A magokat a táptalaj felületére helyeztük. Egy üvegbe átlagosan 4-8 mag került. Egy vetés alkalmával általában 50-500 magot vetettünk. Az egyenletes csírázás érdekében 48 órára termosztátba helyeztük az elvetett magokat 32 °C-ra, majd áthelyeztük a fényszobába, ahol 25±1 °C-on 16 órás megvilágítás és 8 órás sötét periódus mellett neveltük. Két nap múlva számoltuk meg a kicsírázott, vagy esetlegesen befertőzött magokat.

Sárgadinnye folyékony táptalajon

A magok előkészítését minden kísérletben azonos módon hajtottuk végre. A magsterilizálást a következő módon végeztük. A meghámozott sárgadinnye magvak 20 %-os Clorox oldatban történő fertőtlenítését háromszori, 10 percig tartó mosás követte desztillált vízben. A fertőtlenítés után a magokat 6 órán keresztül áztattuk desztillált vízben.

Ezek után a magokat feldaraboltuk, egyszer hosszában (utána lehúзва a maghártyát), majd 5-6-szor kereszt irányban, így magonként 10-12 db 1-4 mm² nagyságú magdarabot kaptunk. Végül a magdarabokat folyékony táptalajban rázattuk.

Tököfélék szilárd táptalajon

A maghéj eltávolítása után a sütőtök, a patisszon és a cukkini magokat 15%-os Clorox oldatba áztattuk. Háromféle fertőtlenítési időt alkalmaztunk, ezek 15, 20 illetve 25 percesek voltak. Az ily módon fertőtlenített magokat lamináris fülkében steril desztillált vízzel öblítettük le. Az öblítést háromszor megismételtük, minden alkalommal 5 percig tartva a steril desztillált vízben a magokat. A vizes magokról steril papírral leitattuk a felesleges nedvességet, majd a magokat kissé a táptalajba nyomva 200ml-es bébiételes üvegbe helyeztük. A növekedésszabályozó anyag mentes táptalajra 5-8 magot vetettünk üvegenként. A magokat 3-4 napig sötétben 32 °C-on csíráztattuk, majd a levelek teljes bezöldüléséig 25 °C-on fényszobában tartottuk őket.

4.2.2. Sárgadinnye regeneráció szilárd táptalajról indítva

4.2.2.1. Magvetés és nevelési körülmények

Kísérleteink során a sárgadinnye magokat meghámoztuk és 15%-os Clorox oldatban 15 percig fertőtlenítettük, majd 3-szor 5 percig öblítettük steril desztillált vízben. Üvegenként 6-8 magot vetettünk növekedésszabályozó anyag mentes MS táptalajra. Az egyenletes csírázás érdekében, 48 órára termosztátba helyeztük az elvetett magokat 32 °C-ra, majd áthelyeztük a fényszobába, ahol 25±1 °C-on 16 órás megvilágítás és 8 órás sötét periódus mellett 4 nap múlva használtuk fel a kicsírázott magok sziklelevelét.

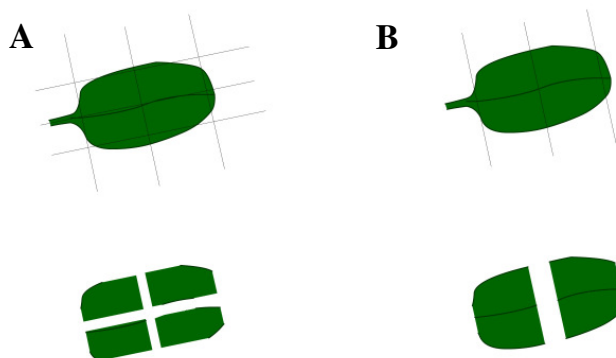
A sziklevek felhasználása azok teljes bezöldülését, maghártyából való kibújását, szétnyílását követően történt, melyek addigra másfél-kétszeresére növekedtek a magi méretükhöz képest. A körülvágott, feldarabolt szikleveleket (**2. ábra**), fonákkal a táptalaj felé, MS alapú táptalajokra helyeztük (pH 5.6 – 5.8).

A regenerációs és transzformációs kísérletek egyaránt fényszobai viszonyok között zajlottak, 25±1 °C-on 16 órás megvilágítás és 8 órás sötét periódus mellett.

4.2.2.2. Sárgadinnye fajták válaszdó képességének vizsgálata különböző táptalajokon

Ebben a kísérletben Javított Zentai, Tétényi csereshéjú, Magyar kincs, Hógolyó sárgadinnye fajták 4 napos szikleveleit négy részre vágva (**2. ábra**) használtuk ötféle táptalajon (MD1, MD2, MD3, MD4, MD5). Minden táptalajra 40 sziklevéldarab került. A kísérleteket három ismétlésben végeztük. A körülvágott és feldarabolt szikleveleket, fonákkal a táptalaj felé, a táptalajokra helyeztük (pH 5.6 – 5.8). Egy 200ml-es bébiételes üvegbe átlagosan 6-8 sziklevéldarabot helyeztünk.

Ezt követően Javított Zentai, Muskotály, Topáz, Hógolyó, Magyar kincs, Ezüstananász, Fortuna, Tétényi csereshéjú és Hale's Best sárgadinnye fajták 4 napos szikleveleit két részre vágva (**2. ábra**) további ötféle táptalajon vizsgáltuk (MD6, MD7, MD8, MD9, MD10). Minden táptalajra fajtánként 40 sziklevéldarab került fonákkal lefelé. A kísérleteket három ismétlésben végeztük. Egy Petri-csészébe nyolc sziklevéldarab került.



2. ábra A sziklevek feldarabolásának módja. A) négyfelé vágás B) kétfelé vágás

4.2.2.3. Tenyészetek indítása különböző növényi részek felhasználásával

Ebben a kísérletben két fajta (Hógolyó és Hale's Best) regenerációját vizsgáltuk különböző növényi részekből kiindulva. Regenerációs táptalajként az MD6-os közeget használtuk.

A kísérletben a 2, 4, 8, 14 napos csíranövények sziklevelét, hipokotilját illetve a 14 napos csíranövény esetében az első lombslevelet használtuk fel a regeneráció kiindulási anyagaként.

A magokat növekedésszabályozó anyag mentes MS táptalajra vetettük, majd termosztátba helyeztük 2 napra 32 °C-ra. Egy fajta esetében átlagosan 100 magot vetettünk egy kísérletsorozatban. Egy üvegbe 4 magnál többet nem vetettünk. A csíranövények egy részét a második napon felvágtuk sziklevéltre, hipokotilra, és dekapitált növényekre, majd ezeket tovább daraboltuk. A szikleveleket négy illetve kétfelé daraboltuk. A hipokotilt három körülbelül egyenlő részre vágtuk fel (sziklevélnél közeli rész, középső rész, gyökérnyak közeli rész), majd függőlegesen 1-2 mm mélyen beleszúrva a táptalajba külön-külön üvegbe helyeztük őket növényi részenként és fajtánként. A dekapitált hipokotilok maradtak abban az üvegben, amelybe elvettük a növényeket. A megmaradt ép csíranövényeket a termosztátból áthelyeztük a fényszobába és a vetéstől számítva a negyedik napon ismét feldaraboltuk a növényanyag egy részét a 2. napon feldolgozott növényekhez hasonlóan. Ezt a kísérletet a

vetéstől számítva a 8. és a 14. napon is megismételtük. Az első lomblevél csak a csírázást követő 14. napon jelent meg általában, ezért ezt a növényi részt csak ebben az egy időpontban vizsgáltuk. A négyfelé vágott sziklevelekből fajtánként és időpontonként 48 darabot helyeztünk le. A kétfelé vágott sziklevelekből 40 darabot, a sziklevélhez közeli hipokotilból, középső hipokotilból, gyökérnyak közeli hipokotilból és az első lomblevélből 20 darabot helyeztünk táptalajra fajtánként és időpontonként. Emellett fajtánként és időpontonként 20-20 dekapitált növény regenerációs képességét vizsgáltuk. A regeneráció hatékonyságát hetente ellenőriztük. Az időközben regenerálódott hajtásokat ill. hajtáskezdeményeket friss regenerációs táptalajra helyeztük. Az eredmények értékelését a 7. héten befejeztük, utána már nem számoltuk az újonnan keletkező hajtáskezdeményeket. A dekapitált hipokotilok azokon a növekedésszabályozó anyag mentes MS táptalajon maradtak, amelyen csíráztattuk a magokat. A dekapitációt Fári és munkatársai (1995) által kidolgozott eljárás alapján végeztük, amelyet eredetileg transzformációra dolgoztak ki.

A lomblevél regenerációját két különböző táptalajon vizsgáltuk. Az egyik a többi növényi részhez hasonló összetételű MD6 táptalaj volt, míg a másik (RAG) táptalaj MS összetételben megegyezett az MD6 táptalajjal, de további adalékként hozzáadtunk AgNO_3 -ot 5.1 mg/l koncentrációban (Yadav et al., 1996). A kísérleteket három ismétlésben végeztük.

4.2.2.4. Növekedésszabályozó anyagok optimalizációja

A kísérletek során a Hógolyó és a Hale's Best fajták 4 napos szikleveleit két részre vágva vizsgáltuk 25-féle táptalaj kombináción. A regenerációs táptalajban benziladenint és indolecetsavat alkalmaztunk 0 és 1.2 mg/l közötti koncentrációban (0, 0.3, 0.6, 0.9, 1.2 mg/l) azonos abszcizinsav (0.26 mg/l) hozzáadása mellett. Egy kísérlet során egy fajtából 50 magot vettünk, majd egy üvegbe négy darab sziklevél szegmenst helyeztünk. Minden egyes kombinációból 2 darab üveg volt kísérletenként. A kísérleteket háromszor ismételtük.

4.2.2.5. Agar és phytagel bázisú szilárd táptalajok összehasonlítása

A Hógolyó sárgadinnye fajta esetében összehasonlító kísérletet végeztünk arra nézve, hogy a regeneráció hatékonyságát befolyásolja-e a táptalajt szilárdító agar vagy phytagel. A kísérletek során a Hógolyó fajta négy napos szikleveleit két részre vágva vizsgáltuk az MDOP1 regenerációs táptalajon, mely 8 g/l agart vagy 2.5 g/l phytagelt tartalmazott. Egy vetés alkalmával átlagosan 15 magot vettünk, tehát a szikleveleket kétfelé vágva átlagosan 55 sziklevéldarabot helyeztünk kísérletenként mindkét típusú táptalajra.

A különböző fejlődési fázisok időtartamát úgy határoztuk meg, hogy megállapítottuk mennyi idő szükséges ahhoz, hogy az adott növény elérje a következő fejlődési fázist. Az

előkísérletek elegendő információt nyújtottak ehhez. Az időtartamon kívül keletkező növényeket már nem számítottuk bele a kísérleti eredményekbe. A regeneránsok fejlődését 2-3 naponta vizsgáltuk. A kísérletet öt ismétlésben végeztük

Az általunk vizsgált fázisok a következők voltak:

1. A csírázástól a sziklevek megfelelő érettségének eléréséig
(A sziklevek teljesen bezöldültek, a maghártyából kibújtak, szétnyíltak)
2. Sziklevel feldarabolásától a hajtáskezdemények megjelenéséig.
(Sziklevéldarabok 75%-án megjelent a hajtáskezdemény)
3. A hajtáskezdemények 1-2 leveles hajtásokká fejlődéséig
(A hajtáskezdemények 50%-a elérte az 1-2 leveles fázist)
4. Az 1-2 leveles hajtások 3-4 leveles hajtássá differenciálódásáig.
(Az 1-2 leveles hajtások 50%-a elérte 3-4 leveles fázist)
5. A 3-4 leveles hajtások meggyökereztetéséig
(Az 3-4 leveles hajtások 75%-a meggyökeresedett)
6. A gyökeres növények akklimatizálásához szükséges időtartam, mely minden esetben 14 nap volt.

4.2.2.6. Regeneráns sárgadinnye növények gyökereztetése és akklimatizálása

A megfelelően differenciálódott leveles "hajtáscsokrokat" hajtásokra osztva (2-5 hajtás) gyökereztető táptalajra helyeztük (növekedésszabályozó anyag mentes MS táptalaj). A megfelelő mértékű gyökérképződést követően steril tőzeg-föld (1:1) keverékébe ültettük át a növényeket. Az inkubálás a fényszobában 100 % relatív páratartalom mellett, 23 ± 3 °C-on történt 0.5 l-es befőttes üvegben, amelynek a tetejét folpackkal lezártuk. Ezután pár nap múlva a fólia szélét meglazítottuk, majd fokozatosan eltávolítottuk. A megerősödött palántákat edzés után üvegházba ültettük ki.

4.2.3. A sárgadinnye regeneráció folyékony táptalajról indítva

4.2.3.1. Tenyésztési körülmények

A folyadékkultúra során tenyészedenyenként 1 magot indítottunk. A folyékony táptalajokat tartalmazó lombikokat körkörös rázómozgású, analóg típusú rázógépre helyeztük (IKA KS250 basic, illetve GFL 3015). A kultúrák rázatása 90 rpm-en fényszobában történt, 25 ± 1 °C-on 16 órás megvilágítás és 8 órás sötét periódus mellett. A folyadékkultúra ideje általában 28-50 nap között mozgott.

4.2.3.2. Előkísérlet a magyar sárgadinnye fajták válaszadó képességének tesztelésére

A regenerációs kísérletekben először az Ezura és Akasaka-Kennedy (2004) által kidolgozott folyékony táptalajt (0.1 mg/l BA, 2 mg/l 2,4-D tartalmú MS) teszteltük a hat magyar sárgadinnye fajtára. Fajtánként hat párhuzamos tenyészetet indítottunk.

4.2.3.3. Növekedésszabályozó anyagok optimalizációja

Az előkísérleteket követően a növekedésszabályozó anyagokkal optimalizációs kísérletet végeztünk a Muskotály fajtával. A kísérlet során a 2,4-D (0; 2; 5 és 10 mg/l) és a BA (0; 0.1; 0.5 és 1mg/l) különböző kombinációit alkalmaztuk (16-féle kombináció) folyékony normál MS táptalajon. Minden növekedésszabályozó anyag kombinációval 4 edényt indítottunk. A négy lombik teljes tartalmát különböző indukciós idők után (7, 14, 28, 34 nap) passzáltuk szilárd táptalajra. Ezt a kísérletet három független időpontban megismételtük. Így végül minden egyes kezelés (növekedésszabályozó anyag kombináció és inkubációs idő) három független ismétlése történt meg. Összesen 192 lombikot indítottunk és passzáltunk át szilárd táptalajra.

A szilárd táptalajon a növénynevelés átlagosan 6-8 hétig tartott, három hetente passzálvá friss táptalajra. A kísérlet értékeléséhez csak a levéllel és gyökérrel rendelkező regenerált növényeket számoltuk össze.

4.2.3.4. A magok életkorának hatása a regenerációra

A magok életkorának és a szomatikus embriogenezis hatékonyságának kapcsolatát a Muskotály sárgadinnye fajtánál analizáltuk. A vizsgálat során érett sárgadinnyéből kieszedett friss magokat és a kereskedelmi forgalomban kapható, egy éves tárolt vetőmagot használtunk fel. Mind a friss, mind a tárolt magból kiindulva 12-12 tenyészetet indítottunk, három ismétlésben. A kísérletben 0.1 mg/l BA és 2 mg/l 2,4-D; 30 g szacharóz tartalmú folyékony MS táptalajt használtunk (pH 5.4). Az indítástól számított 30 nap elteltével szilárd táptalajra helyeztük a mintákat. Három különböző agar koncentrációjú (0.5 %, 1 % és 2 %)

növekedésszabályozó anyag mentes MS táptalajt teszteltünk. A szilárd táptalajra tétel után 21 nap elteltével a minták mindegyikét 1 % agart tartalmazó növekedésszabályozó anyag mentes MS táptalajra passzáltuk és a későbbiekben is ezen neveltük tovább. A felvételezést 5-6 héttel a szilárd táptalajra tétel után végeztük.

4.2.4. A tök fajták regenerációja

A kezdeti regenerációs kísérletekhez alkalmanként 20-30 magot vetettünk mindhárom tökfajtából (Óvári fehér, Black Beauty, Nagydobosi). Ezen kísérletben összesen 2360 sziklevéldarab került leoltásra, az MT1-MT7 táptalajokra.

Mindhárom fajtánál elvégeztünk egy több ismétléses növekedésszabályozó anyag optimalizációs kísérletet melyben indolecetsavat 0-0.9 mg/l és benziladenint 0-1.2 mg/l koncentrációban alkalmaztunk. A kísérlethez fajtánként 40-50 magot vetettünk kísérletenként, három ismétlésben.

A 7-10 napos növények szikleveleit teljes bezöldüléskor, közvetlenül szétnyílás után vagy néhány nappal később, legfeljebb 1-2 lombleveles állapotban használtuk fel. Közvetlenül a levélnyél tövénél levágtuk, majd négy részre vágtuk őket úgy, hogy a levél főerére merőlegesen elharmadoltuk majd a középső harmadot a főérrel párhuzamosan elfeleztük. A kísérletekhez csak a levélnyelet tartalmazó részt és a félbevágott középső harmadot használtuk, a levél csúcsi részét nem.

Mivel a kísérletek során csak a levélnyél közelében képződtek hajtások, a növekedésszabályozó anyag optimalizáló kísérletekhez már csak ezt a részt használtuk fel, így csíranövényenként csak két sziklevéldarabot nyertünk. A sziklevéldarabokat különböző növekedésszabályozó anyagokat tartalmazó táptalaj felületére tettük, egy üvegbe általában négy darabot helyezve. A kísérletekhez 200 ml-es üveget használtunk. A sziklevéldarabokon képződött hajtásokat gyökereztető táptalajra helyeztük, majd a gyökeres növényeket steril tőzeg-föld (1:1) keverékbe ültetve inkubáltuk. Az inkubálás 100% relatív páratartalom mellett, 25 °C-on történt. A megerősödött növényeket edzés után üvegházba ültettük ki.

4.2.5. A baktériumtörzsek tárolási és tenyésztési körülményei

A baktérium törzseket fagyasztó szekrényben tároltuk -80 °C-on. A transzformációs kísérletek előtt egy nappal az LBA4404 törzset szelekciós YEP folyékony táptalajra oltottuk (lásd **10. táblázat**), az A281 törzset pedig LB szilárd táptalajra (**11. táblázat**). A fiatal

tenyészetet 24 órán keresztül 28 °C-on termosztátban ráztuk, a gyors felszaporodás érdekében.

4.2.6. Antibiotikum érzékenység tesztelése

A transzformációs kísérletek megkezdése előtt teszteket végeztünk a Hógolyó és Hale's Best sárgadinnye fajták, továbbá a Nagydobosi sütőtök fajta antibiotikumokkal szembeni érzékenységnek megállapítására. A felhasznált növényi anyagok (frissen feldarabolt kontroll sziklevél szegmensek) antibiotikum tűrőképességét eltérő antibiotikum (augmentin, cefotaxim, carbenicillin) tartalmú táptalajokon teszteltük. Megvizsgáltuk, hogy az *Agrobacterium*-mal történő együtt-tenyésztés után milyen antibiotikum koncentráció az, amely még nem gátolja a növényregenerációt.

A sárgadinnye esetében a kétfelé vágott sziklevél darabjait 0, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 és 1000 mg/l antibiotikum tartalmú táptalajokra helyeztünk le. A kontroll sziklevéldarabok regenerációját MDOP1 (Hógolyó) és MDOP2 (Hale's Best) táptalajokon teszteltük mindhárom antibiotikum jelenlétében külön-külön, 11-féle koncentrációban. Petri-csészénként 4-4 sziklevéldarabot helyeztünk a regenerációs táptalajokra. Egy kísérletben sárgadinnye fajtánként és antibiotikumonként 44 sziklevéldarabot helyeztünk le, összesen 264 sziklevéldarabot.

A vizsgált antibiotikumok mellett teszteltük még a frissen feldarabolt levél szegmensek és kalluszosodott sziklevél szegmensek kanamicinnel (0, 25, 50, 75, 100, 200 mg/l), illetve glufozináttal (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 mg/l) szembeni tűrőképességét. Petri-csészénként 4 - 4 sziklevéldarabot tettünk le regenerációs táptalajokra.

A Nagydobosi sütőtök alsó, levélnyelet tartalmazó sziklevéldarabjait (Petri-csészénként 4 - 4 sziklevéldarabot) szintén eltérő koncentrációjú cefotaximot (0, 250, 500, 750 mg/l), és kanamicint (0, 25, 50, 75, 100, 150 mg/l) tartalmazó regenerációs táptalajokra (MTOP1) helyeztük.

Mind a sárgadinnye mind a tök esetében a kísérleteket 3 ismétlésben végeztük. Az eredmények kiértékelését vizuálisan végeztük.

4.2.7. A sárgadinnye transzformáció körülményei

A transzformációt Qiu és munkatársai (1999) által kidolgozott módszerek alapján végeztük kisebb módosításokkal.

A **transzformáció** során mindig a fertőzést megelőző napon átoltott, 24 órán át rázógépen lombikban, folyékony táptalajon tenyésztett baktérium törzseket használtunk fel.

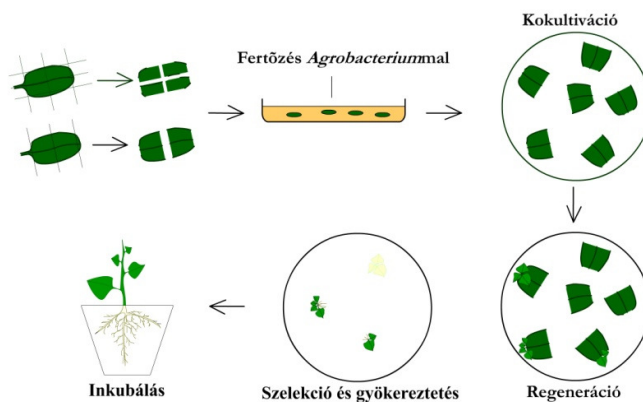
Az A281-es törzzsel a Hógolyó sárgadinnye fajtát fertőztük, majd két különböző (MDOP1, RAG) táptalajon regeneráltuk. Egy transzformációs kísérlet során 40-60 magot vetettünk, majd a szikleveleket két részre vágva átlagosan 200-200 sziklevéldarabot transzformáltunk. Ezt a kísérletet hat ismételtsben végeztük, tehát összesen 2320 sziklevéldarabot fertőztünk.

Az LBA4404-es törzset mind a Hógolyó, mind a Hale's Best sárgadinnye fajták transzformációjánál felhasználtuk.

A Hógolyó fajtával végzett transzformációs kísérletek során 80-120 magot vetettünk, majd a szikleveleket két részre vágva átlagosan 390 sziklevéldarabot fertőztünk kísérletenként. Ezt a kísérletet négy ismételtsben végeztük, tehát összesen 1560 sziklevéldarabot transzformáltunk.

A Hale's Best fajta esetében két kísérletsorozatot indítottunk. Az első alkalommal egyszerre 40-60 magot vetettünk, a szikleveleket két részre vágtuk. Ezen kísérlet során kilenc ismételts végeztünk, tehát összesen 1760 sziklevéldarabot fertőztünk. A második kísérletsorozat során már 340-510 magot vetettünk, a csíráztatott szikleveleket két részre vágtuk, tehát átlagosan 1706 sziklevéldarabot raktunk le egy alkalommal. Összesen 10240 sziklevéldarabot fertőztünk.

A fertőzések során a négy napos körülvágott, majd darabolt sziklevel szegmenseket a baktérium-szuszpenzióba helyeztük különböző időtartamokra (60, 30, 20, 10, 5 percre). Az inkubációs idő elteltével a sziklevéldarabokat steril papíron megszárítottuk, majd regenerációs táptalajra helyeztük, amely még nem tartalmazott antibiotikumot. Egy táptalajra átlagosan hat sziklevéldarabot helyeztünk.



3. ábra Az *Agrobacterium tumefaciens* közvetített transzformáció lépései sárgadinnyénél

A **kokultiváció** során a fertőzött sziklevéldarabokat 2, 3, 4, 5 napig a fényszobában tenyésztettük. Az együtt-tenyésztés (kokultiváció) után szelekciós táptalajra helyeztük a sziklevéldarabokat.

A **szelekció** során az A281-es törzzsel fertőzött sziklevéldarabokat 4 mg/l glufozinát tartalmú regenerációs táptalajra helyeztük. Az itt alkalmazott regenerációs táptalajon az *Agrobacterium* elölésére 500 mg/l augmentint használtunk. Az LBA4404-es törzzsel fertőzött sziklevéldarabokat 100 mg/l kanamicint tartalmazó szelekciós, regenerációs táptalajra helyeztük. A baktérium elölésére 500 mg/l cefotaximot, vagy 700 mg/l carbenicillint alkalmaztuk. Mivel az antibiotikumok viszonylag gyorsan lebomlottak, a sziklevéldarabokat 10-14 naponta friss szelekciós-regenerációs táptalajokra áthelyeztük.

4.2.8. Agar és phytigel tartalmú táptalajok hatása a szelektív táptalajon felnevelt növények regenerációjának hatékonyságára

A **Hógolyó** fajta esetében végeztünk egy összehasonlító kísérletet arra nézve, hogy a vélhetően transzformáns növények regenerációjának hatékonyságát befolyásolja-e a táptalajt szilárdító agar vagy phytigel. A kísérletek során a Hógolyó fajta négy napos szikleveleit két részre vágva vizsgáltuk az MDOP1 regenerációs táptalajon, mely 8 g/l agart vagy 2.5 g/l phytigelt tartalmazott. Egy vetés alkalmával 40 - 60 magot vettünk, tehát a szikleveleket kétfelé vágva átlagosan 200 sziklevéldarabot fertőztünk 5 percig kísérletenként. A sziklevelek egyik felét agar tartalmú, a másik részét phytigel tartalmú táptalajra helyeztük. Összesen 2392 sziklevéldarabot transzformáltunk a kétféle táptalajon együttvéve.

A különböző fejlődési fázisok időtartamát a sárgadinnye regenerációs kísérlethez hasonlóan (4.2.2.5. fejezet) határoztuk meg, annyi különbséggel, hogy a transzformáció után 2 napig tartott a kokultiváció és a regenerációs hatékonyság lecsökkenése miatt a százalékos értékeken változtatnunk kellett. A regeneránsok fejlődését itt is 2-3 naponta vizsgáltuk. A kísérletet hat ismétlésben végeztük

Az általunk vizsgált fázisok a következők voltak:

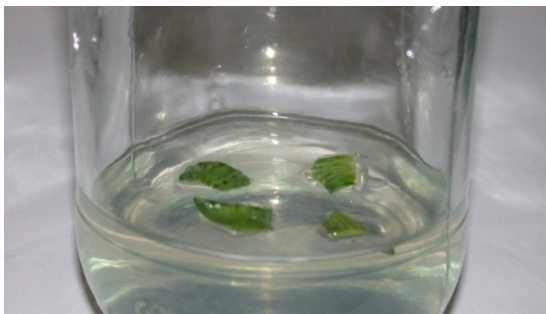
1. A csírázástól a sziklevelek megfelelő érettségének eléréséig
(A sziklevelek teljesen bezöldültek, a maghártyából kibújtak, szétnyíltak)
2. Sziklevel feldarabolásától a kokultiváció végéig (2 nap)
3. Sziklevel regenerációs táptalajra helyezésétől a hajtáskezdemények megjelenéséig
(Sziklevéldarabok 40 %-án megjelent a hajtáskezdemény)
4. A hajtáskezdemények 1-2 leveles hajtásokká fejlődéséig
(A hajtáskezdemények 10 %-a elérte az 1-2 leveles fázist)

5. Az 1-2 leveles hajtások 3-4 leveles hajtássá differenciálódásáig
(Az 1-2 leveles hajtások 50%-a elérte 3-4 leveles fázist)
6. A 3-4 leveles hajtások meggyökereztetéséig
(Az 3-4 leveles hajtások 50%-a meggyökeresedett)
7. A gyökeres növények akklimatizálásához szükséges időtartam, mely minden esetben 14 nap volt.

4.2.9. Tök transzformáció

Transzformációs kísérleteket a sütőtök Nagydobosi fajtával végeztünk, kísérletenként 60 magot vetettünk. A transzformációs kísérletek során ugyanúgy vágtuk fel a szikleveleket, mint a regenerációs kísérletekben (4.2.4. fejezet).

A fertőzés során 24 órája leoltott baktérium törzs szuszpenzióját (LBA4404) használtunk fel. A sziklevéldarabokat különböző időtartamokra (15, 10, 5, illetve 1 percre) a baktérium-szuszpenzióba helyeztük, majd a sziklevéldarabokat steril papíron megszáritottuk, és antibiotikum mentes regenerációs táptalajra helyeztük. Egy 0.2 l-es üvegbe négy sziklevéldarab került. (4. ábra)



4. ábra Sütőtök sziklevéldarabok közvetlenül fertőzés után.

Ezután 1, illetve 3 napig antibiotikum mentes táptalajon együtt tenyésztettük (kokultiváció) a sziklevéldarabokat és az *Agrobacterium*ot. Ez alatt a fertőzött növényeket továbbra is fényszobában 25 ± 1 °C-on 16 órás megvilágítás és 8 órás sötét periódus mellett neveltük.

A néhány napig tartó kokultiváció után az *Agrobacterium* előléséhez újabb táptalajra tettük a sziklevéldarabokat, amely a regenerációhoz szükséges növekedésszabályozó anyagok (1 mg/l IES, 0.1 mg/l BA) mellett 100 mg/l kanamicint és 500 mg/l cefotaximot tartalmazott. A kanamicin szelektív tényezőként szolgált, mivel biztosította, hogy csak a feltehetően transzformáns sejtek fejlődhessenek tovább, a cefotaximot pedig az *Agrobacterium* előlésére használtuk. A megjelenő regeneráns növényeket gyökereztető táptalajra helyeztük, amely szintén tartalmazta a megadott antibiotikumokat a fent leírt mennyiségben.

4.2.10. DNS kivonás tök és sárgadinnye növényekből

A növényekről 1-2 levelet leszedtünk, és a DNS kivonás megkezdéséig -80 °C-on tároltuk őket. Közvetlenül a PCR vizsgálatok előtt a mintákat folyékony nitrogénben, dörzsmozsárban eldörzsöltük, majd külön-külön Eppendorf csövekbe helyeztük. A DNS-t a Qiagen cég DNeasy Plant System Mini Kit DNS-kivonó rendszer felhasználásával vontuk ki a gyártó által meghatározott módszert alkalmazva (QIAGEN, 2000). Az így előállított kb. 200 µl-nyi szűrlet megfelelő tisztaságban tartalmazta a DNS-t.

4.2.11. A DNS beépülésének ellenőrzése PCR (Polymerase Chain Reaction) technikával

A DNS beépülése a genomba PCR-technikával az adott génszakasz felszaporításával ellenőrizhető. Először megvizsgáltuk, hogy sikerült-e kiölni az *Agrobacteriumot* a növényből. Ehhez a VCF és VCR virC génspecifikus primereket használtuk, majd a CP1, CP2 (CMV és ZYMV köpenyfehérje génjére specifikus) primerek segítségével vizsgáltuk, hogy tartalmazza-e a bejuttatni kívánt gént a kivont DNS.

A PCR-reakcióelegyet a **13. táblázat**ban megadott mennyiségekből a táblázatban közölt sorrendben mértük össze.

13. táblázat A PCR reakcióhoz alkalmazott reakcióelegy összetétele:

PCR puffer (a puffer koncentrációja: 10 mM Tris-HCl, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.01% zselatin)	2.5 µl/25 µl
dNTP mix	0.25 µl/25 µl
Primer1	0.5 µl/25 µl
Primer2	0.5 µl/25 µl
Red Taq-polimeráz	1 µl/25 µl
DDV (kétszer desztillált víz)	18.25 µl/25 µl
DNS-minta	2 µl/25 µl

Az kapott oldatot vortexeltük és lecentrifugáltuk, majd 200 µl PCR-csövekbe szétosztottuk. A szétosztott reakcióelegyet tartalmazó minden csőhöz 2-2 µl-nyi növényi DNS-kivonatot adtunk hozzá. Az összemérést steril körülmények között lamináris fülke alatt, steril eszközökkel és steril oldatokkal végeztük.

A 25 µl összterfogatú PCR-reakcióelegyet MJ Research PTC 200 típusú PCR-készülékbe helyeztük, majd a készüléket a **14. táblázat**ban leírt program szerint beállítva elvégeztük az amplifikálást.

14. táblázat Az alkalmazott PCR program jellemzői.

	Folyamat	virC gén vizsgálatához		CP gén vizsgálatához	
		Hőmérséklet	Idő	Hőmérséklet	Idő
1.	Elődenaturáció (hot start)	94 °C	1 perc	94 °C	5 perc
2.	Denaturáció	92 °C	1 perc	94 °C	1 perc
3.	Tapadás (primerek kötődése)	54 °C	1 perc	60 °C	1 perc
4.	Lánchosszabbítás (polimerizáció)	72 °C	1,5 perc	72 °C	2 perc
	2-4. lépések ismétlése	30-szor		40-szer	
5.	Utóbefoltozás	72 °C	3 perc	72 °C	10 perc
6.	Lehűtés	4 °C	∞	0 °C	∞

A PCR reakció során felszaporított DNS szakaszokat a továbbiakban agaróz gélelektroforézissel vizsgáltuk. (Sambrook et al., 1982)

Az 1g agrózt (Sigma) 100 ml TAE pufferben (Az 50-szeres koncentrátumú TAE puffer összetétele: 242 g/l TRIS, 57.1 ml/l koncentrált ecetsav, 100 ml/l 0.5 M EDTA pH=8) 2-3 perc alatt mikrohullámú sütőben főzve feloldottuk. Ezt követően összeállítottuk a futtatáshoz megfelelő kádat. A kb. 50 °C-ra lehűlt gélhez hozzá pipettáztunk 20 µl etidium-bromidot és az oldatot a kádba öntöttük. Miután a gél megszilárdult, a kádat feltöltöttük a TAE pufferrel és a zsebekbe pipettáztuk a PCR-reakció termékét. Az első és az utolsó zsebbe a Promega cég 100 bp-os DNS-létráját, festékként Promega Blue/Orange 6-szoros töménységű komplexeket alkalmaztunk. Az elektroforézist 1 órán át 120 V feszültség alatt végeztük. Az agaróz gélelektroforézis végeredményeképp kapott gél UV megvilágítás mellett lefényképeztük.

4.2.12. Mikroszkópos vizsgálatok

A tenyészetek mikroszkópos vizsgálatát Leica MZ 6 típusú sztereomikroszkóppal végeztük. A felvételeket mikroszkópi feltét segítségével eleinte analóg Minolta géppel végeztük Konica filmre, majd a későbbiekben digitális Canon (Power Shot S50) fényképezőgéppel compact flash memóriakártyára. Az elektron mikroszkópos (SEM) felvételeket a Budapesti Corvinus Egyetem Központi laboratóriumában készítették Tesla BC-300 típusú pásztázó elektron mikroszkóp segítségével.

4.2.13. Statisztikai számítások

A kísérleti adatok varianciaanalízisét és a táptalajok ill. különböző kezelések páronkénti összehasonlítását a MiniStat program segítségével végeztük. A sárgadinnye és tök fajták regenerációs és transzformációs kísérleteit szilárd táptalajon a MiniStat 3.2. programmal (Vargha 2000), míg a sárgadinnye folyékony táptalajon történő regenerációs

kísérleteit MiniStat 3.3. programmal elemeztük (Vargha, 2000). A számítások eredményeit a melléletekben (9.3. Melléklet) részleteztük.

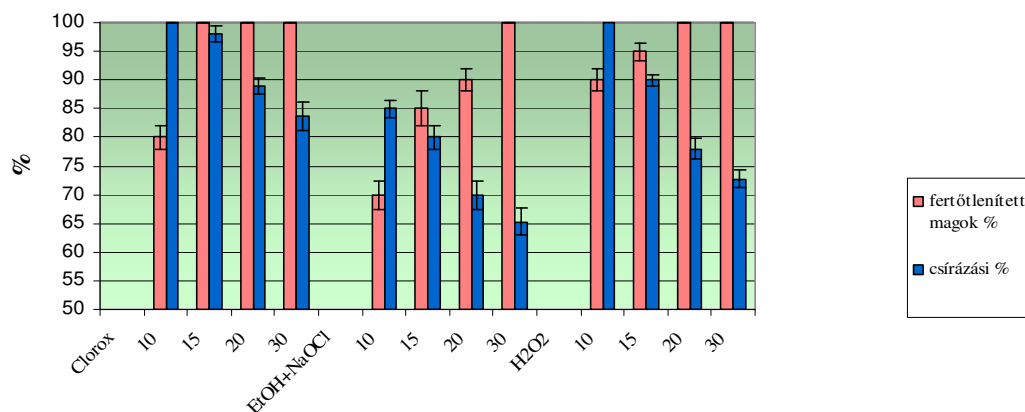
5. EREDMÉNYEK

5.1. A magvak fertőtlenítése

Sárgadinnye magvak fertőtlenítése

A hidrogén-peroxidos, etil-alkoholos (nátrium-hipokloritos), és a Cloroxos fertőtlenítések közül csak azokat a kezeléseket hasonlítottuk össze egyszempontos variancia analízissel, amely kezelésekre hatására 100 %-ban fertőtlenített magokat kaptunk (9.3.1. melléklet). A kezelésekre eredményességét a csírázási százalék adta meg. A három fertőtlenítési mód közül a 15 %-os Cloroxos kezelés bizonyult a legjobbnak. Már 15 perc elteltével 100 %-ban fertőtlenített magokat kaptunk. Ez az érték csak 90 %-os konfidencia-valószínűség mellett tért el szignifikánsan a 20 percig tartó Cloroxos áztatástól. Minden más kezeléstől azonban 95 %-os konfidencia-valószínűség mellett szignifikánsan különbözött. Azon felül, hogy a 15 perces Cloroxos fertőtlenítési idő elegendőnek bizonyult a magok sterilizálásához, ez volt a legkíméletesebb a maghéjtól megfosztott magokhoz, a csírázási arány 98 %-os volt. A másik két fertőtlenítési módszer alkalmazása esetén a csírázási arány szignifikánsan alacsonyabb volt, vagy a fertőtlenítés mértéke nem volt megfelelő. Az etil-alkoholos (nátrium-hipokloritos) kezelés után a magok később csíráztak. A hidrogén-peroxidos kezelés hatására a sziklevelek szöveti állománya megsérült. A kísérleteket három ismétlésben végeztük. Az eredményeket az **5. ábra** hasonlítottuk össze. Ennek alapján a továbbiakban a szilárd táptalajon történő regenerációs és transzformációs kísérletek magvetéseit mindig 15 perces Clorox (15 %-os) fertőtlenítéssel végeztük, minden fajta esetében (**6. ábra**).

A folyékony kultúra indításakor 20 %-os Clorox oldatban történő fertőtlenítés elegendőnek bizonyult (100 %-ban fertőtlenített magokat kaptunk) a csírámentes környezethez. Minden további kísérlet indításakor ezt a fertőtlenítési eljárást alkalmaztuk. A folyadék kultúrában nagyon ritkán jelent meg később bármilyen jellegű fertőzés és az inkább a passzálások során kerülhetett a táptalajba. A sterilizációt követően a magokat 6 órán keresztül áztattuk desztillált vízben.



5. ábra A fertőtlenítési eljárás hatékonyságának és a magok csírázási százalékának alakulása különböző fertőtlenítő eljárások és különböző időtartamú kezelések esetén a Hógolyó sárgadinnye fajtánál.

Fertőtlenített magok % - A be nem fertőződött magok száma százalékosan,
 Csírázási % - A két nap múlva kicsírázott magok száma százalékosan.
 A vízszintes tengelyen az értékek a kezelési időket jelentik percben



6. ábra Hógolyó sárgadinnye fajta fertőtlenített magjainak csírázása növekedésszabályozó anyagmentes MS táptalajon

Tök magvak fertőtlenítése

A sütőtök és a patisszon esetében a 15 perces Cloroxos (15 %-os) sterilizálás bizonyult a legmegfelelőbbnek. Minden további kísérlet indításakor ezt a fertőtlenítési eljárást alkalmaztuk, mindkét fajta esetében, mert a hosszabb sterilizálási idő alkalmazása esetén a csírázási idő elhúzódott, sok mag ki sem csírázott.

A cukkini esetében a 15 perces sterilizálási idő nem volt elég hatékony mivel a magok 30-40 %-a befertőződött. Ha egy üvegben csak egy fertőzött mag volt, a fertőzés a többi magra is áterjedt és így az együtt nevelt 5-8 magból egyet sem tudunk a további kísérletekhez

felhasználni. Emiatt összességében 50-70 %-os veszteség is előfordult. 20 perces sterilizációs időt alkalmazva a patisszonnán és a sütőtöknél tapasztalt problémák (elhúzódo, nehézkes csírázás) nem léptek fel és a magok befertőződését is sikerült megakadályozni. A sterilizálás hatékonyságát tovább növelte, ha fertőtlenítés után a táptalajra helyezés előtt a maghártyát is eltávolítottuk. Így a magok 95%-a kicsírázott, fertőzést pedig az esetek 99 %-ban nem tapasztaltunk. Minden további kísérlet indításakor ezt a fertőtlenítési eljárást alkalmaztuk cukkini esetében, mert a 25 perces sterilizációs idő már jelentős csírázási veszteséget okozott ennél a fajtánál is.

5.2. Regenerációs kísérletek eredményei

5.2.1. A sárgadinnye fajták válaszdó képességének tesztelése szilárd táptalajon

Kezdetben a négy fajta regenerációs képességét vizsgáltuk az MD1, MD2 és MD3 táptalajokon. A Magyar kincs esetében az MD1 és MD2 táptalajokon csak fehér kallusz képződött. Az MD3 táptalajon viszont a kalluszból apró zöld góccok voltak, amelyek nem fejlődtek tovább hajtáskezdeménnyé csak tovább osztódtak minden passzálás után. A Javított Zentai és a Tétényi csereshéjú az MD1, MD2 és MD3 táptalajokon kalluszosodni kezdett, azonban a kapott fehér kalluszból egyik fajta esetében sem fejlődött hajtás.

A Hógolyó sárgadinnye fajta esetében az MD1 táptalajon csak fehér kallusz képződött a sziklevelek szélén. Az MD2 táptalajon a gyenge hajtáskezdés mellett, nagyon intenzív kalluszosodást figyeltünk meg, a kialakult kis hajtáskezdmények azonban 3-4 hét alatt elkalluszosodtak. Az MD3 táptalajon szintén erős kalluszosodást figyeltünk meg, a hajtáskezdmények itt torzultak is voltak. Teljes növényt ezen a táptalajon sem sikerült felnevelnünk.

Megállapíthatjuk, hogy ebben a kísérletben a felhasznált fajták közül a Hógolyó fajtának volt a legjobb válaszdó képessége. A Hógolyó fajta regenerációs képességét további két táptalajon (MD4, MD5) is vizsgáltuk. Az MD4 és MD5 táptalajokon kevésbé kalluszosodott a szikleveledarab. Az alkalmazott növekedésszabályozó anyag összetétel hatására hajtásregenerációt figyelhattunk meg a szikleveledarabok szélén vagy annak közvetlen közelében mindkét vizsgált táptalajon.

A regenerációs képességet kilenc fajtán vizsgálva megállapítottuk, hogy minden fajta esetében sikerült kalluszt indukálnunk. Azonban ezek minősége nagyon eltérő volt. Többsége csak fehér kallusz volt, melyből a későbbiek során csak néhány esetben alakult ki hajtáskezdmény vagy leveles hajtás. Számos fajtán azonban néhány hét elteltével a kalluszból zöld góccok jelentek meg. Ezeknek csak kis része hozott később hajtást.

15. táblázat Regenerációs képesség vizsgálata kilenc sárgadinnye fajta esetében 4 napos sziklevelekből kiindulva

Fajták \ Táptalaj	MD6	MD7	MD8	MD9	MD10
Javított Zentai	0±0b	0.17±0.016a	0±0b	0.23±0.021a	0.22±0.039a
Muskotály	0±0a	0±0a	0±0a	0.1±0.031a	0±0a
Topáz	0±0a	0±0a	0±0a	0±0a	0±0a
Hógolyó	0.97±0.039a	0.46±0.031b	0±0c	0.53±0.046b	0.65±0.047b
Magyar kincs	0±0b	0.11±0.021a	0±0b	0±0b	0.12±0.021a
Ezüstananász	0±0a	0±0a	0±0a	0±0a	0±0a
Fortuna	0±0a	0±0a	0±0a	0±0a	0±0a
Tétényi csereshéjű	0±0b	0±0b	0±0b	0.1±0.027a	0±0b
Hale's Best	1.23±0.046a	0±0c	0±0c	0.46±0.026b	0.34±0.033b

*Az értékek a regeneráció hatékonyságát mutatják sziklevéldarabonként. Az első szám átlag (leveles hajtások száma/szikleléldarab) a második szám pedig a szórás. Minden sorban az azonos betűvel jelzett átlagok nem különböznek szignifikánsan a Tukey teszt alapján 5 %-os szignifikancia szinten (9.3.2. melléklet). A táblázatban sötétzöld színnel azokat az eseteket jelöltük, ahol leveles hajtások képződtek. A világos zöld szín hajtáskezdemények megjelenést jelenti, melyekből nem lett növény. A sárga szín pedig azt az esetet jelöli, ahol a kalluszban zöld góccok jelentek meg. Fehér színnel azokat az eseteket jelöltük, ahol csak fehér kallusz képződést tapasztaltunk.

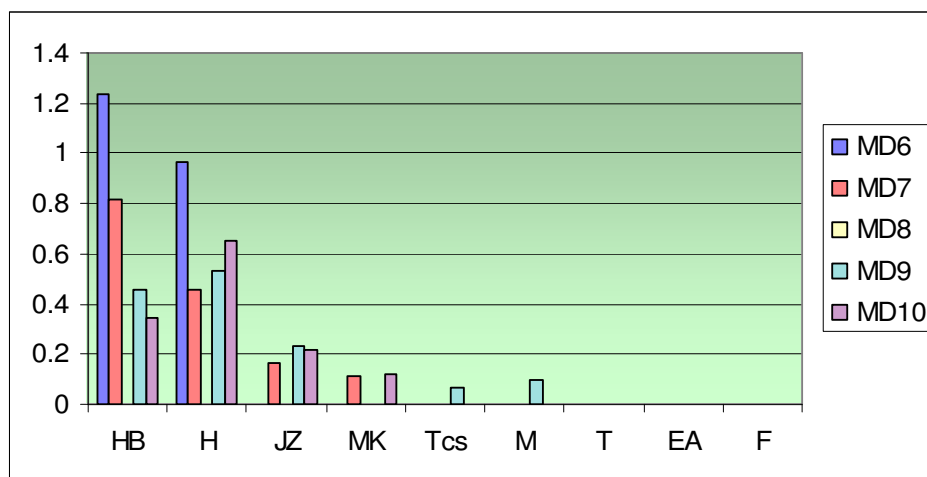
Az MD6-os táptalajon a Hógolyó és Hale's Best fajtákból sikerült 3-4 leveles hajtásokat felnevelnünk. A varianciaanalízis eredménye alapján az MD6-os táptalaj szinifikánsan különbözött minden más táptalajon kapott eredménytől mindkét fajta esetében. A Magyar kincs fajta esetében csak hajtáskezdemények jelentek meg, melyek nem fejlődtek tovább leveles növénné. Az Ezüstanász és a Tétényi csereshéjű fajták esetében zöld góccok jelentek meg a kalluszban. Az összes többi fajta csak fehér kalluszt hozott.

Az MD7 táptalajon Hógolyó, Javított Zentai és a Magyar kincs fajták csökkenő sorrendben hoztak leveles hajtást. A Topáz és az Ezüstanász fajták esetében hajtáskezdemények megjelenését figyeltük meg. A Fortuna és Hale's Best esetében csak zöld góccok jelentek meg a kalluszban. A fennmaradó két fajta esetében csak fehér kallusz képződést figyeltünk meg.

Az MD8-as táptalajon egyik fajta esetében sem sikerült regenerációt indukálni. Egyedül a Javított Zentai esetében figyeltünk meg zöld góccokat a kalluszban.

Az MD9 táptalajon a Hógolyó, Hale's Best, Javított Zentai, Muskotály és Tétényi csereshéjű fajták adtak leveles hajtást, csökkenő eredményességi sorrendben. A Topáz fajtán hajtáskezdemények fejlődtek a sziklevéldarabokon. Az Ezüstanász és Fortuna fajták

elkalluszosodott sziklevelein zöld gócek jelentek meg. A Magyar kincs esetében csak elkalluszosodtak a sziklevéldarabok.



7. ábra Regenerációs képesség vizsgálata kilenc különböző sárgadinnye fajta esetében sziklevélből kiindulva 5-féle szilárd táptalajon (MD6-10). HB: Hale's Best; H: Hógolyó; JZ: Javított Zentai; MK: Magyar kincs; M: Muskotály; T: Topáz; EA: Ezüstananász; F: Fortuna

Az MD10 táptalajon Hógolyó, Hale's Best, Javított Zentai és a Magyar kincs fajták hoztak leveles hajtást. A fennmaradó fajták (Muskotály, Topáz, Ezüstananász, Fortuna és Tétényi csereshéjú) esetében hajtáskezdemények jelentek meg. Az eredményeket a **15. táblázat** hasonlítottuk össze.

A három független kísérlet eredményeként megállapítottuk, hogy a kilenc vizsgált fajta közül a Hógolyó és a Hale's Best fajták regenerációs képessége volt a legjobb. Az ötféle táptalaj közül pedig az MD6-os táptalajon nyertük a legtöbb teljes értékű hajtást, ezért a növényi rész kiválasztásához is ezt a növekedésszabályozó anyag összetételt használtuk. (7. ábra) Mindamellet elmondhatjuk, hogy elsőként sikerült a Javított Zentai, Muskotály, Tétényi csereshéjú és a Magyar kincs esetében növényt regeneráltunk *in vitro* körülmények között sziklevélből kiindulva.

5.2.2. Az indításra használt növényi részek befolyása a regenerációs képességre szilárd táptalajon

A **Hale's Best** fajta esetében az MD6-os táptalajon megvizsgáltuk a különböző növényi részek (sziklevel, hipokotil, dekapitált hipokotil, első lomblevél) regenerációs képességét.

A kísérlet eredménye, hogy a Hale's Best fajta a sziklevélből regenerált a legjobban, függetlenül attól hány részre vágtuk fel, egy magra visszavezetve. Azonban a sziklevek kora erősen befolyásolta a keletkezett hajtások számát.

16. táblázat A különböző növényi részek válasza MD6 regenerációs táptalajon a Hale's Best sárgadinnye fajta esetében a hetedik héten.

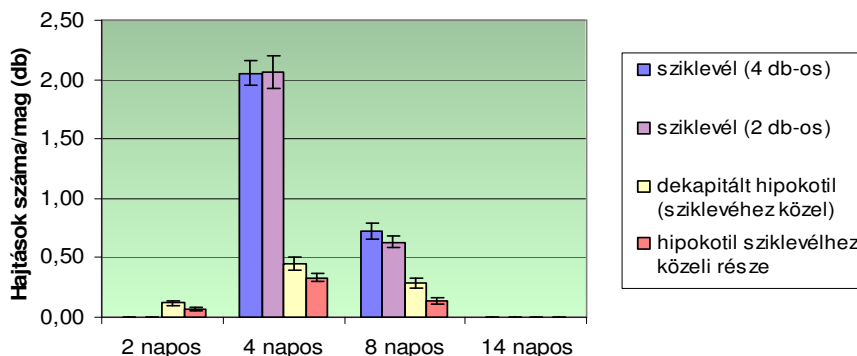
csíranövény kora növényi rész	2 napos	4 napos	7 napos	14 napos
sziklevel (4 db-os)	fehéres-zöldes kallusz	3-4 leveles hajtások	3-4 leveles hajtások	fehér kallusz
sziklevel (2 db-os)	fehéres-zöldes kallusz	3-4 leveles hajtások	3-4 leveles hajtások	fehér kallusz
hipokotil sziklevelhez közeli része	3-4 leveles hajtások	3-4 leveles hajtások	3-4 leveles hajtások	fehér kallusz
hipokotil középső része	fehér kallusz	fehéres-zöldes kallusz	fehéres-zöldes kallusz	fehér kallusz
hipokotil gyökérnyak felett	fehér kallusz	fehér kallusz	fehér kallusz	fehér kallusz
dekapitált hipokotil (növekedésszabályozó anyagmentes MS)	3-4 leveles hajtások deformált	3-4 leveles hajtások	3-4 leveles hajtások	kemény zöld kallusz
első lomblevél (MD6)	-	-	-	fehér kallusz
első lomblevél (RAG)	-	-	-	fehér kallusz

A 2 napos csíranövények esetében a sziklevélből nem kaptunk hajtást csak a dekapitált hipokotilból (0.12 hajtás/hipokotil) és a hipokotil sziklevel közeli részéből (0.07 hajtás/hipokotil rész) (**16. táblázat**).

A legjobb eredményt a 4 napos kétfelé vágott sziklevek esetében kaptuk. Ebben az esetben sziklevéldarabonként 1.03 hajtást tudtunk regenerálni. A második legjobb eredményt a 4 napos négyfelé vágott sziklevek hozták regeneráció szempontjából (0.51 hajtás/sziklevéldarab). A harmadik legjobb eredményt a 4 napos dekapitált hipokotilon kaptuk (0.45 hajtás/hipokotil). Azonban itt gyakrabban előfordult, hogy a kapott növények deformáltak voltak. Gondot okozott továbbá, hogy a hipokotilok erősen megnyúltak, majd az üveg tetejét elérve visszahajlottak. A hipokotil sziklevelhez közeli részéből szintén sikerült növényeket regenerálnunk átlagosan, 0.33 hajtást hipokotil részenként. A hipokotil középső része féhéres-zöldes kalluszt hozott, azonban ebből nem fejlődött hajtás a későbbiekben.

A 8 napos csíranövények részei mind kevesebb hajtást hoztak mint akár a leggyengébben válaszoló négy napos növényi részek (hipokotil sziklevélhez közeli része). Az eredmény növényi részenként: sziklevél (2 db-os) 0.18 hajtás/sziklevéldarab, dekapitált hipokotil 0.28 hajtás/hipokotil, sziklevél (4 db-os) 0.31 hajtás/sziklevéldarab, hipokotil sziklevél közeli része 0.13 hajtás/hipokotil rész.

A 14 napos növények részei pedig egyáltalán nem voltak válaszadók.



8. ábra A különböző növényi részek regenerációs képességének összehasonlítása a Hale's Best sárgadinnye fajta esetében, MD6 szilárd táptalajon egy magra nézve

A 4 napos hajtások esetében szignifikáns különbséget találtunk az egyes növényi részek regenerációs képessége között (**8. ábra**) egy magra nézve. Az egyes és a kettes csoport (2 darabra vágott sziklevél és 4 darabra vágott sziklevél) nem különbözik szignifikánsan egymástól 5 %-os szignifikancia szinten a regenerált hajtások számát illetően magból kiindulva, viszont a 3-as és 4-es csoport (dekapitált, és hipokotil) ezektől szignifikánsan rosszabb hatékonyságot mutat. Mivel nem tapasztaltunk különbséget a kétfelé és a négyfelé vágott szikleveleknél egy magból kiindulva a felnevelhető növények számát tekintve, ezért a további kísérletekben kétfelé vágtuk a szikleveleket (9.3.3. melléklet).

A **Hógolyó** fajta esetében szintén az MD6-os táptalajon vizsgáltuk a különböző növényi részek regenerációs képességét (sziklevél, hipokotil, dekapitált hipokotil, első lomblevél) (**17. táblázat**).

A kísérlet eredménye, hogy egy magra visszavezetve a Hógolyó fajta a sziklevélből regenerált a legjobban, függetlenül attól hány részre vágtuk fel. Azonban a sziklevelek kora erősen befolyásolta a keletkezett hajtások számát.

A 2 napos csíranövények esetében a sziklevélből és hipokotilból nem kaptunk hajtást csak a dekapitált hipokotilból (0.07 hajtás/hipokotil). Ezek a regeneránsok kissé le voltak

maradva a 4 napos regeneránsokhoz képest. A szikleveleken megjelentek hajtáskezdemények csoportosan, de ezekből nem fejlődött teljes értékű növény a későbbiekben. Előfordult, hogy apró levelek megjelentek, de nem fejlődtek tovább.

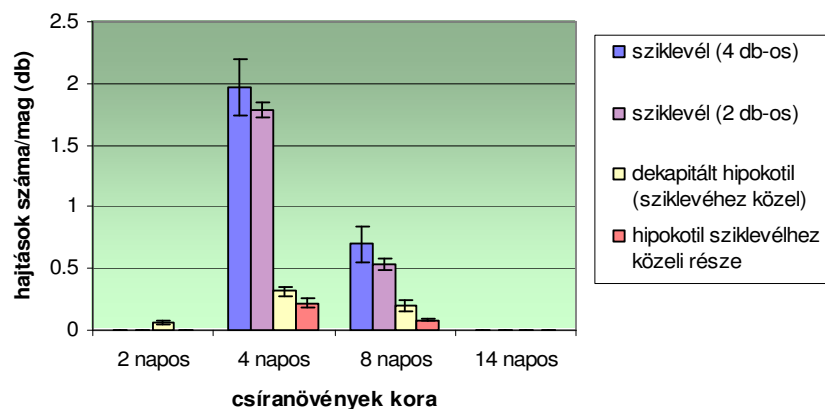
17. táblázat A különböző növényi részek válasza MD6 regenerációs táptalajon a Hógolyó sárgadinnye fajta esetében a hetedik héten.

csíranövény kora növényi rész	2 napos	4-5 napos	7-8 napos	10-14 napos
sziklevél (4 db-os)	hajtáscsokrok	3-4 leveles hajtások	3-4 leveles hajtások	fehér kallusz
sziklevél (2 db-os)	hajtáscsokrok	3-4 leveles hajtások	3-4 leveles hajtások	fehér kallusz
hipokotil sziklelevélhez közeli része	fehér kallusz	3-4 leveles hajtások	hajtás-kezdemények	fehér kallusz
hipokotil középső része	fehér kallusz	hajtás-kezdemények	fehér kallusz	fehér kallusz
hipokotil gyökérnyak felett	fehér kallusz	fehér kallusz	fehér kallusz	fehér kallusz
dekapitált hipokotil (növekedésszabályozó anyagmentes MS)	3-4 leveles hajtások	3-4 leveles hajtások	3-4 leveles hajtások	kemény zöld kallusz
első lomblevél (MD6)	-	-	-	fehér kallusz
első lomblevél (RAG)	-	-	-	fehér kallusz

A legjobb eredményt a 4 napos kétfelé vágott sziklevelek esetében kaptuk. Ebben az esetben sziklevéldarabonként átlagosan 0.89 hajtást tudtunk regenerálni. A második legjobb eredményt a 4 napos négyfelé vágott sziklevelek hozták regeneráció szempontjából (0.49 hajtás/sziklevéldarab). A harmadik legjobb eredményt a 4 napos dekapitált hipokotilon kaptuk (0.32 hajtás/hipokotil). A hipokotil sziklelevélhez közeli részéből szintén sikerült növényeket regenerálnunk átlagosan 0.13 hajtást hipokotil részenként. A hipokotil középső részén hajtáskezdemények jelentek meg, amelyekből azonban nem fejlődött hajtás a későbbiekben.

A 8 napos csíranövények részei mind kevesebb hajtást hoztak, mint a négy napos növényi részek. Az eredmény növényi részenként: sziklelevél (2 db-os) (0.27 hajtás/sziklevéldarab), dekapitált hipokotil (0.2 hajtás/hipokotil), sziklelevél (4 db-os) (0.17 hajtás/sziklevéldarab), a hipokotil sziklelevél közeli részén csak hajtáskezdemények jelentek meg.

A 14 napos növények részei egyáltalán nem voltak válaszadók.



9. ábra A különböző növényi részek regenerációs képességének összehasonlítása a Hógolyó sárgadinnye fajta esetében, MD6 szilárd táptalajon egy magra nézve

A 4 napos hajtásoknál szignifikáns különbséget találtunk az egyes növényi részek regenerációs képessége között (**9. ábra**). Az egyes és a kettes csoport (2 darabra vágott sziklevél és 4 darabra vágott sziklevél) nem különbözik szignifikánsan egymástól 5 %-os szignifikancia szinten a regenerált hajtások számát illetően egy magokból kiindulva, viszont a 3-as és 4-es csoport (dekapitált hipokotil és a hipokotil sziklevélhez közeli része) ezekről szignifikánsan rosszabb hatékonyságot mutat (9.3.4. melléklet).

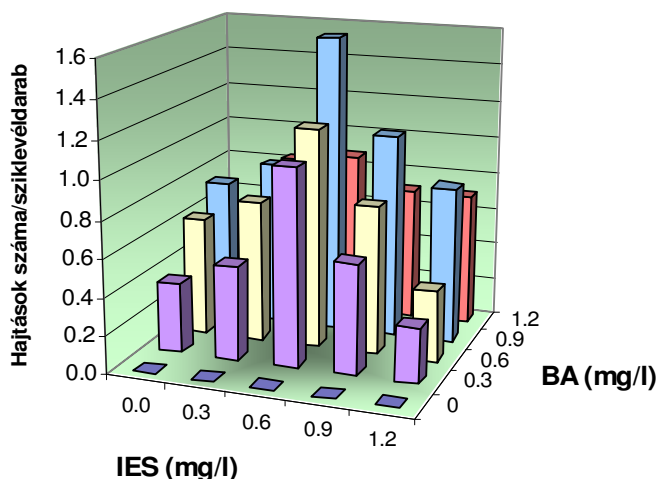
5.2.3. Szilárd táptalajok növekedésszabályozó anyag összetételének hatása sárgadinnye regenerációjára

Mivel a Hógolyó és Hale's Best sárgadinnye fajtáknak jó volt a válaszó képessége, beállítottunk egy három-ismétléses növekedésszabályozó anyag optimalizációs kísérletet, a minél hatékonyabb hajtásregeneráció érdekében mindkét fajtára. A kísérletben benziladenint és indolecetsavat alkalmaztunk 0 és 1.2 mg/l közötti koncentrációban, 0.26 mg/l abszcizinsav hozzáadása mellett (**10. ábra** és **11. ábra**).

A **Hógolyó** fajtán a vizsgált 25-féle növekedésszabályozó anyag kombináció 80 %-án hajtásregenerációt figyeltünk meg (**10. ábra**). Átlagosan 2 hét elteltével a legtöbb sziklevéldarabon hajtáskezdemény fejlődött. A hajtáskezdemények azonban nem voltak egyenértékűek. Voltak apró hajtászsokrok, amelyek 3-4 hét elteltével sem fejlődtek tovább, hanem elkalluszosodtak.

A hajtásképződés mellett intenzív fehér színű kallusz képződést figyeltünk meg a 0.6 mg/l benziladenin koncentráció felett, illetve 0.3 – 0.9 mg/l közötti indolecetsav koncentrációkban. A 0.9 mg/l indolecetsav és 0.9 mg/l benziladenin koncentráció felett torzult hajtások is előfordultak, ezeket nem számítottuk bele a sikeresen felnevelt hajtások számába.

A legszebb, átültetésre alkalmas hajtások a 0.9 mg/l benziladenin és 0.6 mg/l indolecetsav összetételű táptalajon fejlődtek (MDOP1). Itt akár négy hajtáskezdemény is megjelent egy sziklevéldarabon, azonban ezekből végül átlagosan 1.58 teljes értékű hajtást tudtunk regenerálni. A további regenerációs és transzformációs kísérleteket ezzel a növekedésszabályozó anyag kombinációval végeztük a Hógolyó fajta estében.



10. ábra Hógolyó sárgadinnye fajta organogén hajtásindukciójának gyakorisága az indolecetsav és a benziladenin függvényében

Azokon a táptalajokon, amelyekben nem volt benziladenin (0 mg/l BA), a sziklevéldarabok nem növekedtek, 1-2 hét alatt besárgultak, majd elhaltak. (**10. ábra**)

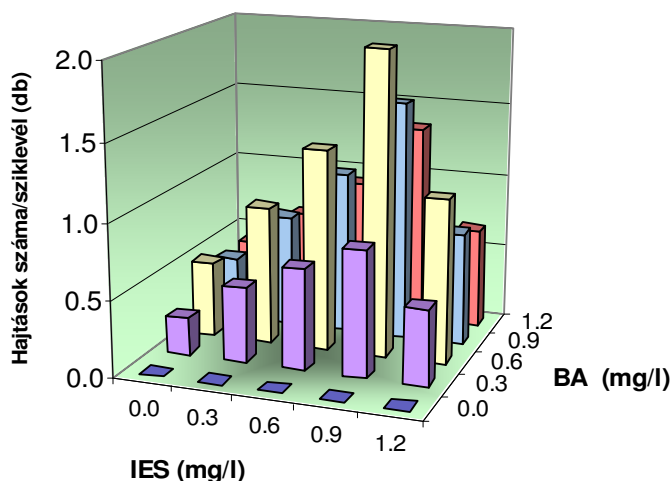
A benziladenin koncentráció növelésével emelkedett a regenerált hajtások átlagos száma sziklevéldarabonként. Azt tapasztaltuk, hogy a 0.9 mg/l BA-t tartalmazó táptalajokon sikerült a legtöbb növényt felnevelnünk. Azonban, ha tovább emeltük a benziladenin mennyiségét, akkor már nem növekedett, hanem csökkent a felnevelhető hajtások száma. A páronkénti összehasonlításból az is kiderült, hogy a 0.9 mg/l BA -t tartalmazó táptalaj eredményei szignifikánsan különböztek a 0, 0.3, 0.6, 1.2 mg/l BA-t tartalmazó táptalajok eredményeitől, 5%-os szignifikancia szinten (9.3.5. melléklet).

A 0.6 mg/l indolecetsav koncentrációjú táptalajokon neveltük fel a legtöbb hajtást, az ezen koncentráció alatti (0.3 mg/l IES) és feletti (0.9; 1.2 mg/l IES) esetekben már kevesebb hajtás keletkezett. Ezt az eredményt a variancia analízis is alátámasztotta, 5 %-os szignifikancia szinten.

A **Hale's Best** fajtán a vizsgált 25-féle növekedésszabályozó anyag kombináció 80 %-án hajtásregenerációt figyeltünk meg (**11. ábra**). Átlagosan 1-2 hét elteltével a legtöbb sziklevéldarabon erőteljes kalluszosodást figyeltünk meg. A sziklevéldarabok megduzzadtak

és többszörösükre nőttek. A harmadik hét körül megjelentek a hajtáskezdemények az elkalluszosodott sziklevélszéleken.

A legszebb, átültetésre alkalmas hajtások a 0.6 mg/l benziladenin és 0.9 mg/l indolecetsav összetételű táptalajon fejlődtek (MDOP2). Sziklevéldarabonként átlagosan két teljes értékű hajtást tudtunk regenerálni (9.3.6. melléklet). A további regenerációs és transzformációs kísérleteket ezzel a növekedésszabályozó anyag kombinációval végeztük.



11. ábra Hale's Best sárgadinnye fajta organogén hajtásindukciójának gyakorisága az indolecetsav és a benziladenin függvényében

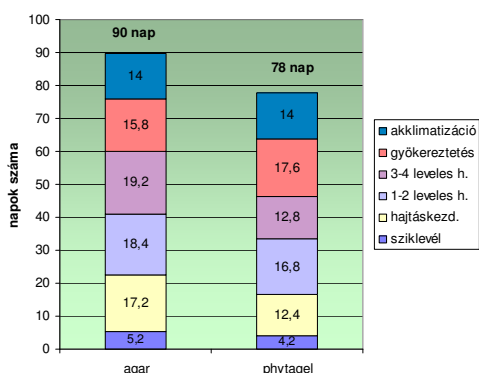
A benziladenint nem tartalmazó táptalajokon (0 mg/l BA) nem figyeltünk meg hajtásfejlődést, csak minimális kalluszosodást, a sziklevéldarabok pár hét alatt besárgultak, majd elhaltak. (**11. ábra**)

A 0.6 mg/l benziladenin koncentrációjú táptalajokon neveltük fel a legtöbb hajtást, az ezen koncentráció alatti (0.3 mg/l BA) és feletti (0.9; 1.2 mg/l BA) esetekben már kevesebb hajtást keletkezett. Ezt az eredményt a variancia analízis is alátámasztotta, 5 %-os szignifikancia szinten.

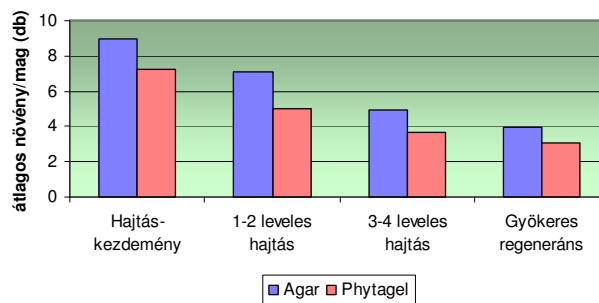
Az indolecetsav koncentráció növelésével emelkedett a regenerált hajtások átlagos száma sziklevéldarabonként. Azt tapasztaltuk, hogy a 0.9 mg/l IES-t tartalmazó táptalajokon sikerült a legtöbb növényt felnevelnünk. Azonban ha tovább emeltük az indolecetsav mennyiségét, akkor már nem növekedett, hanem csökkent a felnevelhető hajtások száma. A páronkénti összehasonlításból az is kiderült, hogy a 0.9 mg/l IES-t tartalmazó táptalaj eredményei szignifikánsan különböztek a 0, 0.3, 0.6, 1.2 mg/l IES-t tartalmazó táptalajok eredményeitől, 5 %-os szignifikancia szinten (9.3.6. melléklet).

5.2.4. Az agar ill. a phytagel tartalmú szilárd táptalajok hatásának összehasonlítása a regenerációs hatékonyság növelése érdekében

A Hógolyó fajtára regenerációjának idejét vizsgálva az agar illetve phytagel tartalmú regenerációs táptalajon, azt az eredményt kaptuk, hogy a phytagel tartalmú táptalajokon a regeneráció szignifikánsan rövidebb időt vett igénybe, mint az agar tartalmú táptalajon. A növényeket phytagel tartalmú táptalajon nevelve a regeneráció átlagosan 78 napot vett igénybe, szemben az agar tartalmú táptalajjal, melyen egy növény teljes felnevelése átlagosan 90 napig tartott (**12. ábra**). Ez az időtartam magában foglalja a sziklevek megvágásától a növények kiültetéséig eltelt időt. A kísérletet hat ismétlésben végeztük. A kétmintás t-próba és a Welch-féle próba is szignifikánsan eltérőnek mutatta az agar és a phytagel tartalmú táptalajt, 1 %-os szignifikancia szinten (9.3.10. melléklet). Azonban a felnevelt gyökeres regeneránsok számát tekintve a kétféle táptalaj (agar, phytagel) nem mutat eltérést 5 %-os szignifikancia szinten (**13. ábra**).



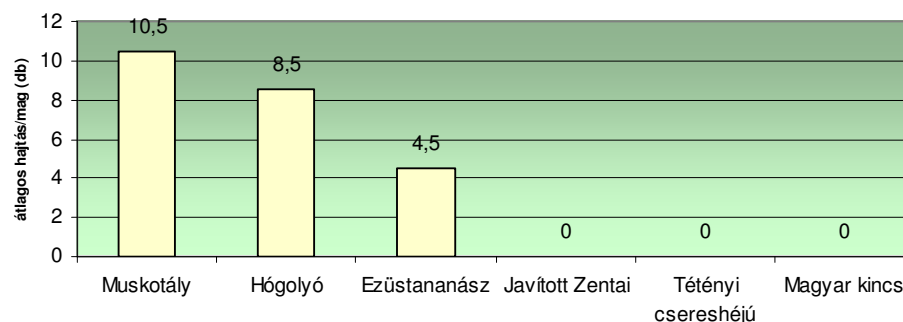
12. ábra Az Hógolyó sárgadinnye fajta regenerációs idejének alakulása agar illetve phytagel tartalmú táptalajokon. A különböző színek az egyes in vitro fejlődési fázisokat jelölik.



13. ábra Hógolyó regeneráció hatékonyságának összehasonlítása agar és phytagel bázisú táptalajokon, a különböző fejlődési fázisokban. Az ábrázolt értékek egy magra vonatkoznak

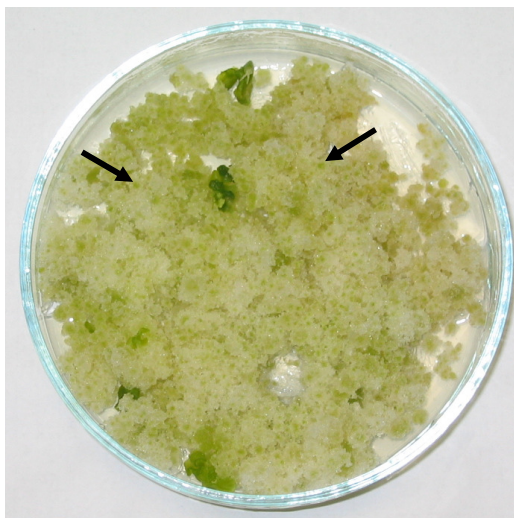
5.2.5. A sárgadinnye fajták válaszdó képességének tesztelése folyékony táptalajon

A kísérletek során hat különböző magyar sárgadinnye fajtát teszteltünk MD12-es táptalajon. A fajták között nagy különbség mutatkozott a válaszdó képesség tekintetében. A Muskotály és a Hógolyó fajták reagáltak legjobban a kezelésre. Nagy mennyiségű embriogén kalluszt fejlesztettek, melynek mennyisége a passzálások során is nőtt. Az indított hat-hat tenyészetből a Muskotály fajta esetében átlagosan 10.5 növény/mag, a Hógolyó fajta esetében pedig átlagosan 8.5 növény/mag keletkezett (**14. ábra**).



14. ábra Regenerációs képesség vizsgálata hat különböző magyar sárgadinnye fajta esetében folyékony táptalajon magból kiindulva (0.1 mg/l BA, 2 mg/l 2,4-D)

A Javított Zentai, a Tétényi csereshéjú és a Magyar kincs erősen kalluszosodott, azonban növényt nem sikerült regenerálnunk. Az Ezüstananász fajtánál a kalluszban apró zöld gócok voltak megfigyelhetők (**15. ábra**). Ezek nagy része azonban nem fejlődött tovább csak osztódott, másik része tovább differenciálódott. Az Ezüstananász fajtából átlagosan 4.5 növény/mag regenerálódott.



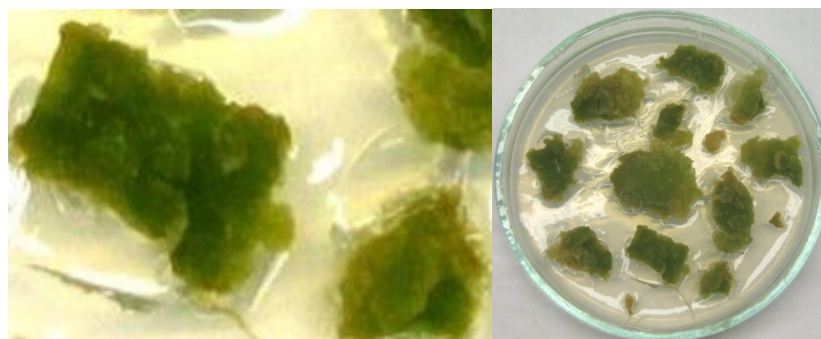
15. ábra Ezüstananász sárgadinnye fajta 28 napig MD12 táptalajon rázatott, majd 25 napig szilárd növekedésszabályozó anyag mentes MS táptalajon tartott tenyésztete. A nyilak embriogén gócokat jelölnek.

5.2.6. Folyékony táptalajok növekedésszabályozó anyag összetételének hatása a sárgadinnye regenerációjára

A folyékony táptalajon végzett, regenerációs képességet vizsgáló kísérleteink során a felhasznált sárgadinnye fajták közül a Muskotály fajtának volt a legjobb válaszadó képessége (5.2.5. fejezet), ezért ezzel a fajtával beállítottunk egy több ismétléses növekedésszabályozó anyag optimalizációs kísérletet, a minél hatékonyabb növényregeneráció érdekében.

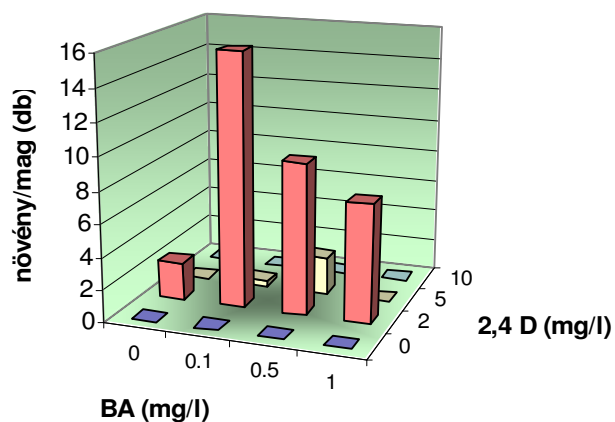
A kísérletben BA-t és 2,4-D-t alkalmaztunk, a BA koncentrációja 0 mg/l és 1 mg/l között mozgott, a 2,4-D koncentrációja, pedig 0 mg/l és 10 mg/l között. Négy különböző indukciós időt alkalmaztunk, 7, 14, 21 és 34 nap hosszúságút. Ez azt jelentette, hogy ennyi ideig rázattuk a magdarabokat a növekedésszabályozó anyag tartalmú folyékony táptalajokon.

Ha nem adtunk auxint (**0 mg/l 2,4-D**) a táptalajhoz, akkor nem volt jelentős eltérés a bezöldülő magdarabok között. Sem a különböző indukciós idők, sem a különböző BA koncentrációk tekintetében nem mutatkoztak szemmel látható különbségek. A hozzáadott BA mennyiségének növelésével arányosan nőttek a magdarabok, továbbá kizöldültek. Ezeken a tenyészeteken igen kevés kallusz képződött. (**16. ábra**)



16. ábra. A Muskotály sárgadinnye fajta magdarabjai 0 mg/l 2,4-D és 0.5 mg/l BA hatására megnövekedett, kizöldült magdarabok szilárd táptalajon (21 napos indukció). A felvétet az indítástól számolt harmincadik napon készült.

A **2 mg/l 2,4-D** tartalmú növekedésszabályozó anyag kombinációk közül a 7 és 14 napig rázatott mintáknál egyik növekedésszabályozó anyag kombináció mellett sem keletkeztek növények. Ezeken a magdarabokon csak gyenge kalluszképződést tapasztaltunk. A BA mennyiségének emelése ebben az esetben is csak a szövetek méretét növelte kis mértékben. Látványosabb eredményeket a 21 és 34 napig indukált szövettenyészetek produkáltak. Huszonegy nap után a 0 mg/l BA és az 1 mg/l BA esetében egyaránt 0.33 darab növény keletkezett átlagosan magonként, míg 0.1 mg/l-es BA koncentrációnál átlagosan 2.66 darab, 0.5 mg/l BA tartalomnál pedig átlagosan 2 darab növény fejlődött ki magonként. Legjobb eredményt a kísérlet során a 34 napig rázatott magdarabok hozták. (**17. ábra**) Ezeknél a mintáknál 0 mg/l BA esetén átlagosan 2.33 darab, 0.1 mg/l BA mellett átlagosan 15.66 darab, 0.5 mg/l BA hozzáadásával átlagosan 9.33 darab, az 1 mg/l BA koncentrációjú tenyészet esetén pedig átlagosan 7.33 darab növényt sikerült felnevelni magonként.



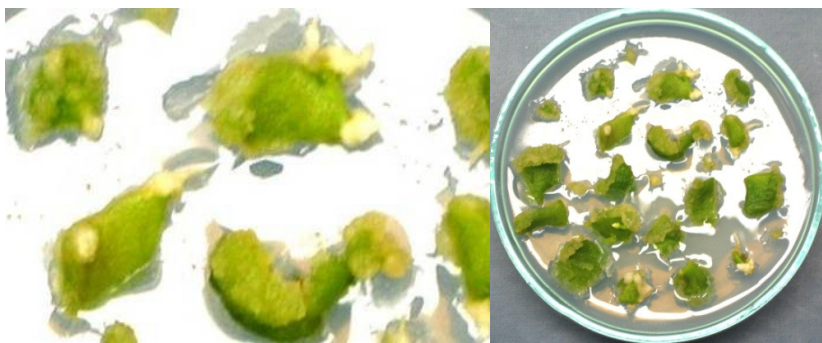
17. ábra Muskotály fajta növekedésszabályozó anyag optimalizációs kísérlete (34 napos indukció) Az ábrázolt növényszám a kezelésenként nyert egy magra jutó átlagos növényszámot jelenti.

A 2 mg/l 2,4-D sorozat 21 és 34 nap indukciós idejű magdarabok nagy részénél igen intenzív kallusz képződést figyeltünk meg. A kallusz gyakran az egész Petri-csészét kitöltötte (**18. ábra**).



18. ábra Muskotály sárgadinnye fajta regeneráló növényei és intenzív kalluszképzés szilárd növekedésszabályozó anyag mentes táptalajon (34 nap ráztatás után, 2 mg/l 2,4-D; 0.5 mg/l BA)

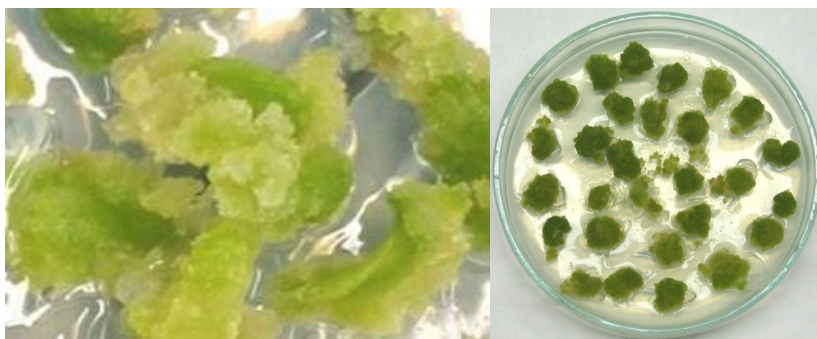
Az **5 mg/l 2,4-D** tartalmú táptalaj sorozatnál erős gyökérképződést tapasztaltunk a magdarabok vágási felületén, a hét, tizennégy és huszonegy napig ráztatott tenyészeteknél egyaránt. A legerőteljesebb gyökérképződést a 7 napos, a leggyengébbet a 21 napos indukció után figyeltük meg a szilárd táptalajon. Ezek a gyökerek általában vastag, merev szövetűek, nem elágazóak voltak, hosszuk 1 cm körül mozgott (**19. ábra**). A 7, 14 és 21 napos indukciós idejű bezöldülő magdarabok gyengén kalluszosodtak.



19. ábra Képződő gyökerek, kezdeti stádiumban, növekedésszabályozó anyag mentes szilárd táptalajon (5 mg/l 2,4-D, 0,5 mg/l BA, 21 napos indukció után)

Embriogenezist az 5 mg/l 2,4-D tartalmú sorozatnál csak a 34 napos 0.1 mg/l BA, illetve a 0.5 mg/l BA koncentrációjú tenyészeteknél sikerült indukálni. Az előbbinél átlagosan 0.33 darab, az utóbbinál átlagosan 2.33 darab növényt sikerült regenerálnunk magonként. A növények egy elenyésző része kissé torzult hajtásokat hozott, később ezeket nem tudtuk üvegházba kiültetni. Ennél a sorozatnál is megfigyelhető volt, hogy a szegmensek mérete magasabb BA koncentráció mellett enyhén megnőtt.

A **10 mg/l 2,4-D**-t tartalmazó táptalaj sorozat esetében nem figyeltünk meg szomatikus embriogenezist, és nem tudtunk növényeket regenerálni. A 7, 14 és 21 napos rázatási idejű magdarabokon gyökérképződést figyeltünk meg, mely a 14 napos tenyészetben volt a legerőteljesebb. Ez azonban még így is elmaradt az 5 mg/l 2,4-D tartalmú táptalajokon képződött gyökerek mennyiségétől. A 34 napos inkubációs idő alkalmazásakor nem tapasztaltuk gyökérképződést. A magdarabok közepesen kalluszosodtak el, szöveti felépítésük laza szivacsos volt, nem embriogén jellegű. A feldarabolt mag részei kezdetben zöldek voltak, egy-két hét elteltével besárgultak, majd egy részük elhalt (**20. ábra**).



20. ábra Közepesen kalluszosodott magdarabok növekedésszabályozó anyag mentes szilárd táptalajon, (10 mg/l 2,4-D, 1 mg/l BA tartalom mellett, 34 napos indukció)

5.2.7. A magok életkorának hatása a regenerációra

A friss és a tárolt magokból indított tenyészetek esetében már 5 nappal az indítás után szembetűnő különbség mutatkozott, a friss magokból indított tenyészetekben a feldarabolt mag növekvő részei nagyobbak és zöldebbek voltak. Mindkét esetben a magdarabok megnöttek, a feldarabolt mag részeiek szélén embriogén kallusz képződött. Az embriogén sejtek egy része a ráztatás során a folyékony táptalajban leszakadva további szomatikus embriókat eredményezett. A tizenkettedik napra azonban a tárolt magból indított tenyészetek behozták lemaradásukat, hasonló szintre kerültek. A friss magoknál enyhe vitrifikációt tapasztaltunk, a minták szöveti felépítése kissé keményebb, merevebb, enyhén üveges volt. Ennek kiküszöbölésére három különböző agar koncentrációjú (0.5 %, 1 % és 2 %) táptalajt teszteltünk, mind a friss, mint a tárolt magoknál. A mintákat harminc nap elteltével tettük szilárd táptalajra.

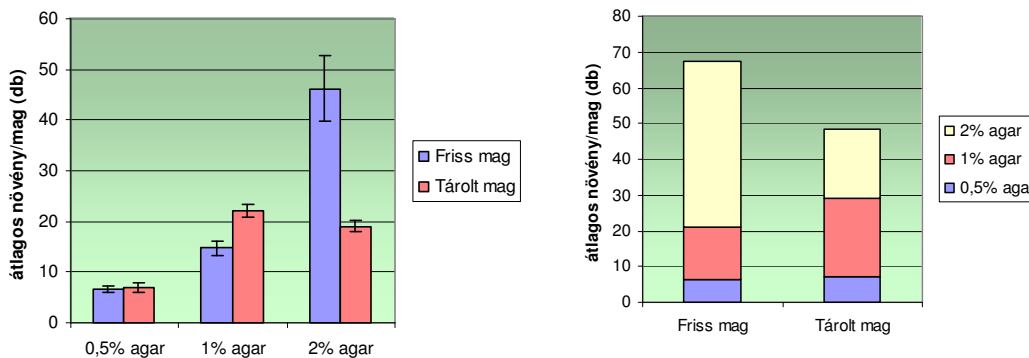
Mind friss, mind a tárolt magból indított tenyészetek rosszul reagáltak a kezdeti 0.5 % agar koncentrációra. A növények körülbelül 70 %-a vitrifikáció tüneteit mutatta. Ez korlátozta későbbi fejlődésüket is. Az első két torzult levél után a minták kevesebb, mint fele volt képes egészséges hajtásokat hozni. A tárolt magokból indított tenyészeteknél 0.5 %-os agar tartalmú táptalajon átlagosan 7 darab növény regenerálódott magonként, a friss magból kiindulva pedig átlagosan 6.5 darab.

A tárolt magból kiinduló tenyészeteken az 1%-os agar tartalmú táptalajon átlagosan 22.25 darab növény fejlődött ki magonként, friss mag esetén ez a szám 14.75 darab volt.

A 2 % agart tartalmazó táptalajokon a tárolt magokból kiindulva átlagosan 19 darab növény/mag keletkezett, míg friss magok esetében átlagosan 46.25 darab.

A tárolt magvak esetében a 2 %-os agar tartalmú táptalajon gyakran fennállt a kiszáradás veszélye, mivel a táptalaj keménysége miatt az embriók nem tudtak eléggé belesüllyedni, így vízellátásuk nem volt megfelelő, az embriók egy részét emiatt elvesztettük. Friss magvak esetében nagy volt a vitrifikáció aránya (magasabb mint 50 %).

A **21. ábra** a friss és tárolt magokból indított regenerációs kísérlet összesítését tartalmazza a Muskotály fajtánál. A bal oldali diagramm (a) azt mutatja, hogy a különböző táptalajokon átlagosan mennyi növényt sikerült regenerálni magonként. A jobb oldali diagramm (b) pedig azt ábrázolja, hogy a friss és a tárolt magokból összesen mennyi növény regenerálódott. A kísérlet eredményeinek kiértékeléséhez egy tényezős és kétféle tényezős általánosított variancia analízist végeztünk, a MiniStat 3.3-as programmal, melynek eredményei a 9.3.11. mellékletben találhatók.



21. ábra a) Muskotály sárgadinnye fajta friss és tárolt magvaiból indított tenyészetek összehasonlítása, különböző agar koncentrációjú táptalajokon

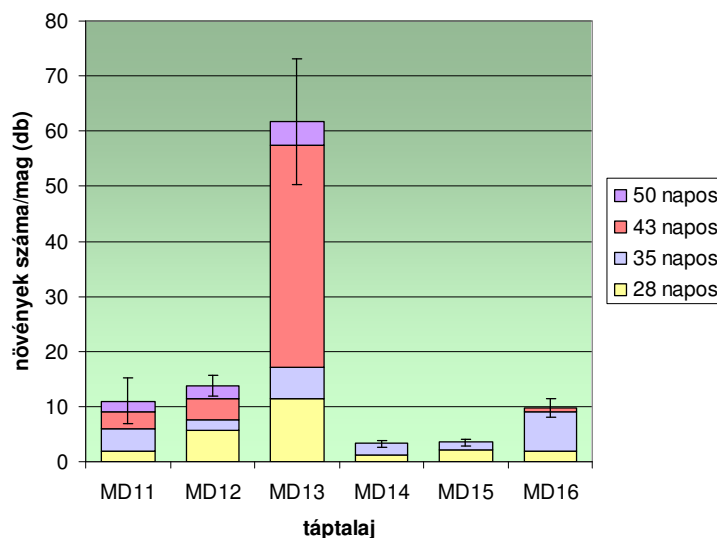
b) A regenerált növények száma összesítve friss és tárolt Muskotály magok esetében

5.2.8. A folyékony táptalaj összetevőinek hatása az embriogenezisre

A kísérlet során hat különböző folyékony táptalajon (MD11, MD12, MD13, MD14, MD15 és MD16) indítottunk tenyészetet Muskotály és Hógolyó fajtákkal, illetve teszteltük az Ezüstananász fajta válaszképességét MD11 és MD13 táptalajon.

A **Muskotály** fajta esetében az MD11 táptalajon összesen 129 növényt állítottunk elő (átlagosan 11 db növény magonként). Az MD12 táptalajon 167 növény regenerálódott (átlagosan 13.8 db növény/mag). A legjobb eredményt a Muskotály fajta tenyésztése során az MD13 táptalaj alkalmazása hozott, ahol összesen 864 regenerált növényt kaptunk (átlagosan 61.71 db növény/mag). A glükóz tartalmú MD14 táptalajon a Muskotály fajtánál mindössze 13 növény keletkezett (átlagosan 3.25 db növény/mag), a szintén glükóz alapú MD15 táptalajon pedig 14 növény (átlagosan 3.5 db növény/mag). A vegyes szénforrású MD16 táptalajon 39 növény fejlődött (átlagosan 9.75 db növény/mag). Az eredmények feldolgozásához egy tényezős általánosított variancia analízist végeztünk, a MiniStat 3.3-as programmal. Az eredményei a 9.3.12 mellékletben találhatók.

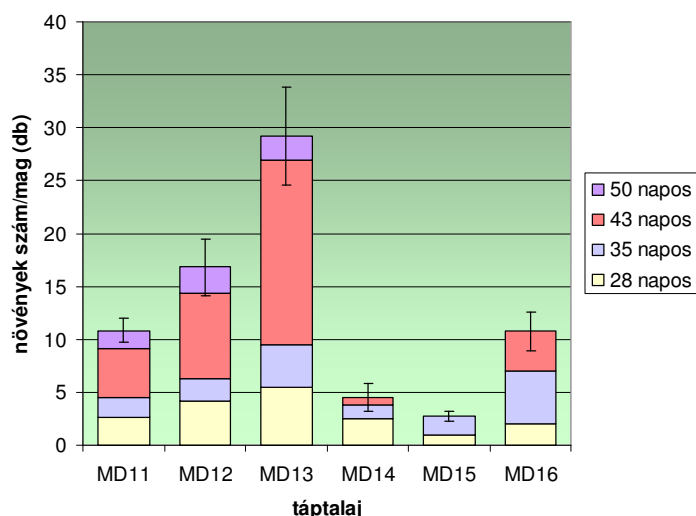
A **22. ábra** mutatja a különböző táptalajokon regenerált növények átlagos számát magonként, a Muskotály fajta esetében. A diagrammon függőleges oszlopok az átlagos növényszámot jelzik magonként az adott táptalajnál. A különböző színek az adott indukciós idő alatt egy magból regenerált növények számának megoszlását mutatják.



22. ábra A regenerált átlagos növényszám magonként a Muskotály sárgadinnye fajtánál, a hat különböző folyékony táptalaj esetén

Ugyanezt a kísérletet azonos feltételek mellett elvégeztük a **Hógolyó** fajtán is. Itt azt tapasztaltuk, hogy az MD11 táptalajon 68 db növény keletkezett (átlagosan 10.83 db növény/mag). Az MD12 táptalajon összesen 101 db növényt kaptunk (átlagosan 16.83 db növény/mag), az MD13 táptalaj használatakor 536 db növényt regeneráltunk (átlagosan 29.18 db növény/mag). Hógolyó fajta esetében az MD14 táptalajon 18 db növény regenerálódott (átlagosan 4.5 db növény/mag). Az MD15 táptalajon mindössze 11 db növény keletkezését tapasztaltuk (átlagosan 2.75 db növény/mag), végül az MD16 táptalajon 43 db növény fejlődött (átlagosan 10.75 db növény/mag). Az eredmények feldolgozásához egy tényezős általánosított variancia analízist végeztünk, a MiniStat 3.3-as programmal. A statisztikai számítás eredményei a 9.3.13 Mellékletben találhatók

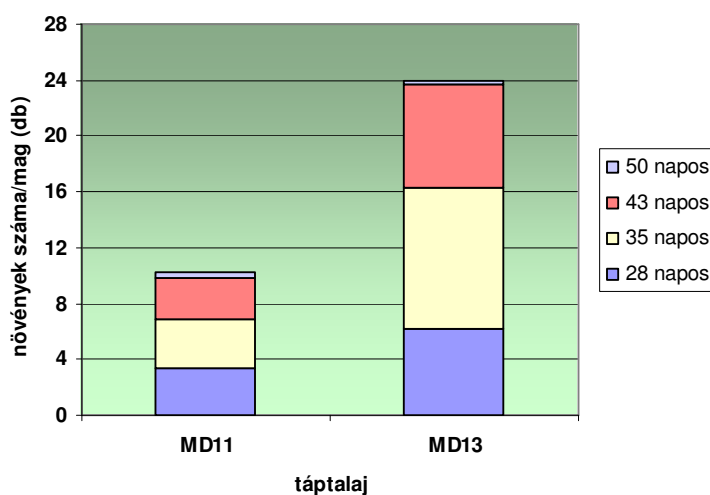
A **23. ábra** mutatja a különböző táptalajokon regenerált növények átlagos számát magonként, a Hógolyó fajta esetében. A diagramm jelölései megegyeznek a **22. ábra** láthatókkal



23. ábra Regenerált növények átlagos száma magonként a Hógolyó sárgadinnye fajtánál a hat különböző folyékony táptalaj esetén

Később az **Ezüstananász** fajtát is bevontuk a kísérletbe. Ennél a fajtánál azonban csak az MD11 és MD13 táptalajok tesztelésére került sor. Az MD11 táptalajon összesen 61 db növény regenerálódott (átlagosan 10.17 db növény/mag). Ezzel szemben az MD13 táptalajon 144 db fejlődött (átlagosan 24 db növény/mag). Az eredmények feldolgozásához kétmintás t-próbát végeztünk a MiniStat 3.3-as programmal. A statisztikai eredményei a 9.3.14 mellékletben találhatók

Az alábbi diagrammon ábrázoltuk az MD11 és az MD13 táptalajon regenerált növények átlagos számát magonként, az Ezüstananász fajta esetében. (**24. ábra**) A diagram jelölései megegyeznek a **22. ábra** láthatóakkal.



24. ábra Regenerált növények átlagos száma magonként az Ezüstananász fajtánál

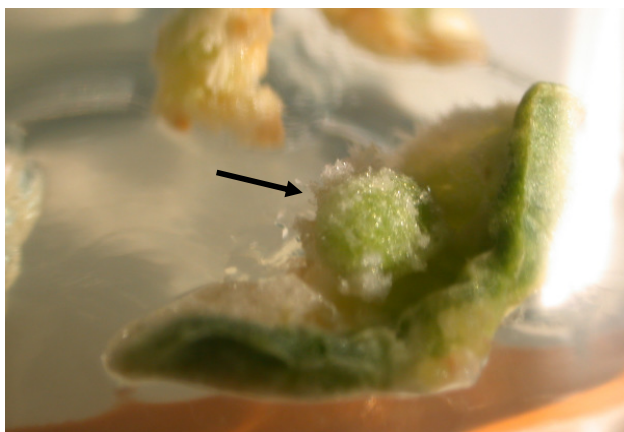
5.2.9. A regenerációs kísérletek eredményei szilárd táptalajon tökfélék esetében

A hétféle táptalaj és három fajta válaszdó képességének kapcsolatát vizsgálva megállapíthatjuk, hogy az egyes fajták hasonló növekedésszabályozó anyag kombinációjú táptalajon regenerálódtak jól, de regenerációs képességben nem egyeznek.

A 2,4-D-t tartalmazó táptalajokon (MT1, MT2, MT3 és MT4) mindhárom fajtánál csak fehér kallusz megjelenését és gyökeresedést figyelhattunk meg, sok sziklevéldarab kallusz képzés nélkül elhalt. A 2,4-D-t különböző koncentrációban tartalmazó táptalajok között a regeneráció szempontjából nem figyeltünk meg eltérést, és a kinetin alkalmazása sem módosította az eredményeket.

Az IES és BA hatására a MT5, a MT6 és a MT7 táptalajokon mind a Nagydobosi sütőtök fajta mind a Black Beauty cukkíni fajta esetében a sziklevéldarabokon zöld kallusz fejlődött, (25. ábra) majd 7-14 nap múlva mindkét fajta esetében organogén hajtásképződés indult meg. Mindkét fajta esetében egy-egy sziklevéldarabon általában több hajtáskezdemény megjelenését is megfigyeltük, de ezekből általában egy levéldarabon legfeljebb egy fejlődött növényé, átlagosan a Nagydobosi sütőtök esetében 0.25, a Black Beauty fajtánál 0.32 hajtás/szikleléldarab. Az egyes fajták és táptalajok között csak a képződött hajtások mennyiségében mutatkozott eltérés.

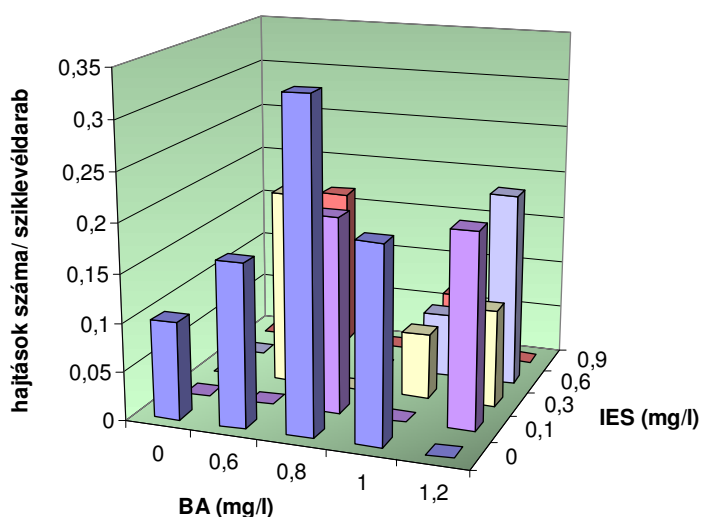
Az általunk vizsgált fajták közül a legrosszabb regenerációs képességűnek az Óvári fehér patisszon fajta bizonyult, ahol a három táptalajon átlagosan 0.11 hajtás/szikleléldarab regenerációját figyeltük meg. Az eredmények értékeléséhez többtényezős varianciaanalízist alkalmaztunk MiniStat 3.2 segítségével (Vargha, 2000).



25. ábra Fejlődő kallusz 8 nappal a leoltás után Nagydobosi sütőtök fajta sziklevéldarabján, MT5 táptalajon

5.2.10. Növekedésszabályozó anyag optimalizációs kísérletek szilárd táptalajon, három tökféle esetében

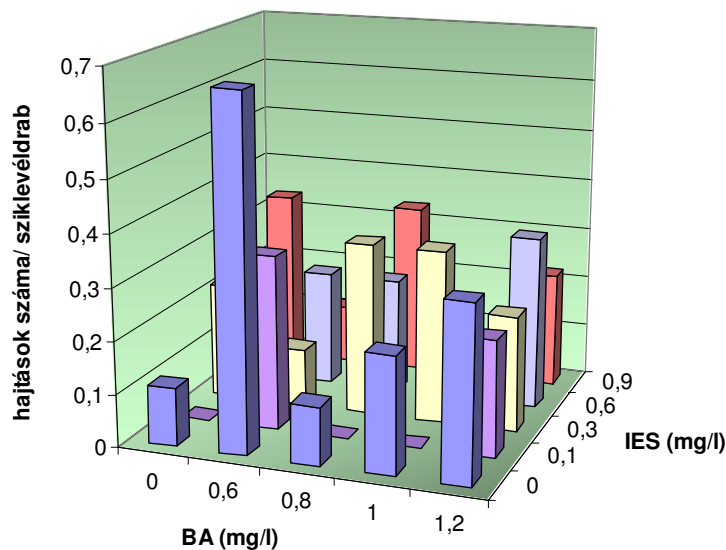
Az **Óvári fehér patisszon fajta** növekedésszabályozó anyag optimalizációs kísérletében (26. ábra) sikerült hajtást regenerálni de csak kis mennyiségben. Azon a kombináción, amelyik legjobbnak bizonyult (0.8 mg/l BA és 0 mg/l IES), magonként egy darab hajtást tudtunk regenerálni átlagosan. Megállapítottuk, hogy a regenerációt elősegíti a BA jelenléte, az IES növekvő mennyisége ellenben egyre kevesebb hajtás megjelenését eredményezte. A növekedésszabályozó anyagok és a regeneránsok száma közti összefüggést a variancia analízis nem mutatta ki (9.3.7 melléklet).



26. ábra Az Óvári fehér patisszon fajta hajtásindukciójának gyakorisága az indolecetsav és a benziladenin függvényében sziklevéldarabonként

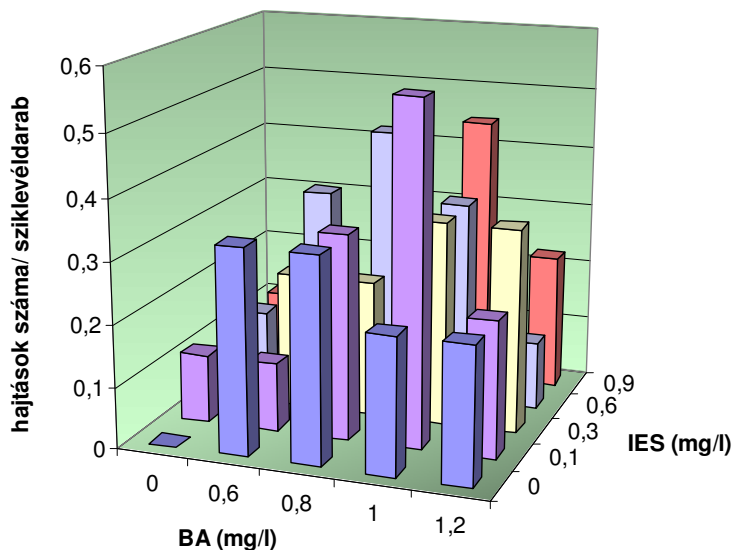
A **Black Beauty cukkini fajta** esetében már a növekedésszabályozó anyag optimalizációs kísérleteket megelőzően is sikerült hajtást regenerálni a MT5, a MT6 és a MT7 táptalajokon. A kísérlet eredménye (27. ábra) alapján a Black Beauty cukkini fajtánál nem lehetett egyértelmű összefüggést kimutatni a növekedésszabályozó anyag koncentráció változás és a regeneráció között, a variancia analízis (9.3.8 melléklet) nem mutatott összefüggést a növekedésszabályozó anyag összetétel és a megjelent hajtások száma között. Az általunk kipróbált kombinációk közül egy kiugró értéket találtunk, ez a táptalaj 0.6 mg/l BA-t tartalmaz, IES-at pedig egyáltalán nem (2.0 darab növény magonként).

Az Óvári fehér patisszon fajtához hasonlóan itt is egy olyan táptalajt találtunk, amelyik lényegesen hatásosabbnak bizonyult a regeneráció szempontjából, mint a korábban kipróbált táptalajok.



27. ábra A Black Beauty cukkíni fajta hajtásindukciójának gyakorisága az indolecetsav és a benziladenin függvényében szikleveleddarabonként

A tökfélék közül a legtöbb regeneránt a **Nagydobosi sütőtök fajta** esetében kaptuk, két kombináció kivételével (0 mg/l BA és 0 mg/l IES, valamint 0 mg/l BA és 0.3 mg/l IES) mind a 25 különböző növekedésszabályozó anyag kombinációjú táptalajon képződtek hajtások (28. ábra). A legtöbb hajtás keletkezését 1 mg/l BA és 0.1 mg/l IES hozzáadása mellett tapasztaltuk, ezen a táptalajon magonként átlagosan 1.6 hajtást regeneráltunk (MTOPI). Csak ennél a fajtánál figyeltük meg, hogy kis mennyiségű IES hozzáadása hatékonyabbá tette a regenerációt. A Óvári fehér patisszon fajtához hasonlóan itt is jól megfigyelhető volt a BA pozitív hatása a regenerációra, ezt a varianciaanalízis (9.3.9. melléklet) is kimutatta.



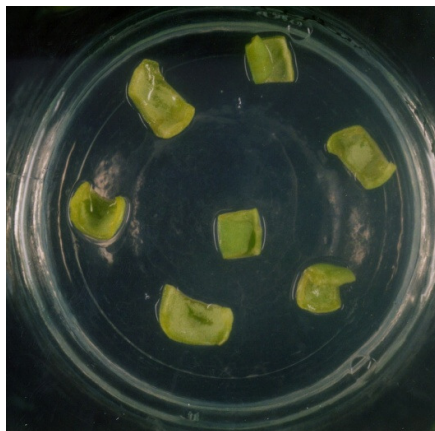
28. ábra A Nagydobosi sütőtök fajta hajtásindukciójának gyakorisága az indolecetsav és a benziladenin függvényében szikleveleddarabonként

5.2.11. A sárgadinnye regeneráció jellegzetes fázisai szilárd táptalajon

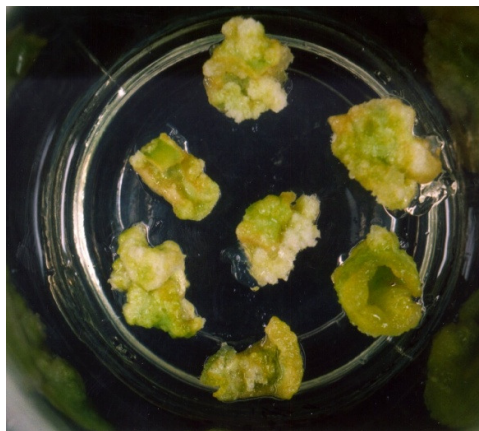
Kísérleteink során bebizonyosodott, hogy szilárd táptalajon a Hógolyó és a Hale's Best fajtáknak volt a legjobb válaszadó képessége a vizsgált fajták közül. A következő képeken a Hógolyó fajta organogén hajtásregenerációját figyelhetjük meg, MDOP1 táptalajon phytagellel kiegészítve. A regeneráció első lépése a megfelelően bezöldült maghártyából kibújt sziklevelek kiválasztása. A sziklevelek érettsége fontos befolyásoló tényező volt a regeneráció során. A 4 napos csíranövények még nem teljesen szétnyílt levelei voltak a legalkalmasabbak (**29. ábra**). A kiválasztott szikleveleket körbevágtuk, majd kétfelé vágtuk. A **30. ábra** a sziklevéldarabokat láthatjuk 2 nappal a leoltás után MDOP1 regenerációs táptalajon



29. ábra Hógolyó sárgadinnye fajta 4 napos sziklevelei közvetlenül a felhasználás előtt.



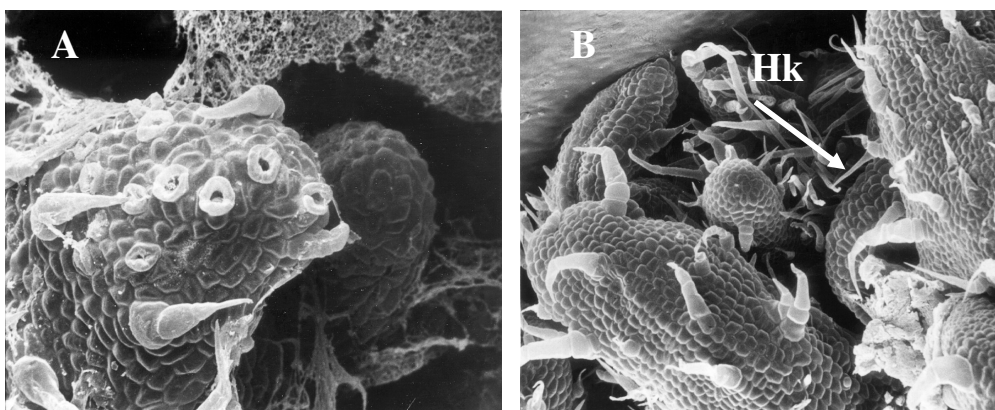
30. ábra Hógolyó sárgadinnye fajta kétfelé vágott sziklevelei MDOP1 táptalajon,



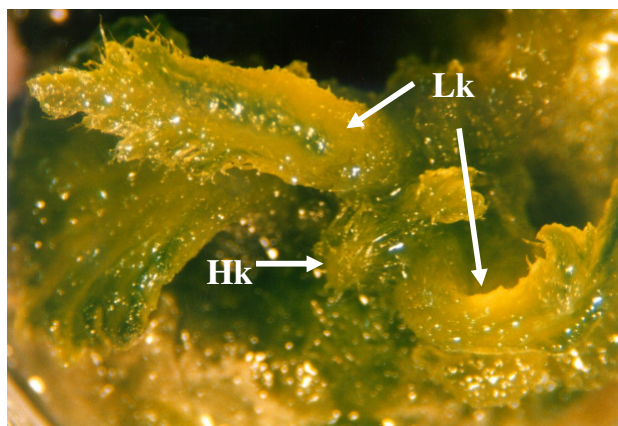
31. ábra Hógolyó sárgadinnye fajta két hetes sziklevéldarabjai a MDOP1 regenerációs táptalajon

A feldarabolt sziklevek a regenerációs táptalajra való helyezést követően 1 hét elteltével megduzzadtak, méretük megnőtt és enyhén kalluszosodni kezdtek. A kalluszosodást nem csak a sebfelületen, hanem annak közvetlen közelében, az ép szöveti részeken is megfigyeltünk (**31. ábra**).

A képződő kallusz sejtek felrepszítették az epidermiszt. A kalluszosodás megindulása után, de néhol már ezzel egy időben, 10-14 nap elteltével a sziklevéldarabok szélein és felületén direkt organogén hajtásindukció volt megfigyelhető (**32. ábra/A**). Először apró hajtásdudorok jelentek meg, majd a hajtások növekedni kezdtek. Ezt követően a hajtásokon szörképletek képződtek (**32. ábra/B**), majd kis levélkék differenciálódtak (**33. ábra**).



32. ábra Pásztázó elektron mikroszkópos felvételek Hógolyó sárgadinnye fajta estében (SEM)
 A) Az epidermiszt felrepszítő kallusz sejtek és a mögöttük előtörő hajtások
 B) A fejlődő hajtáskezdemények (Hk) és rajtuk képződött szörképletek



33. ábra Hógolyó sárgadinnye fajta regenerált hajtása (Hk) levélkezdeménnyel (Lk), MDOP1 táptalajon

A sziklevél szélek elkalluszosodott részéről a direkt organogenezissel keletkezett hajtásokat és hajtáscsokrokat leválasztottuk és új MDOP1 táptalajra helyeztük (**34. ábra**).

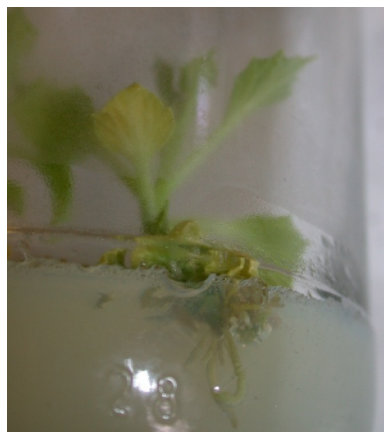


34. ábra A Hógolyó sárgadinnye fajta leválasztott hajtáskezdeményei MDOP1 táptalajon



35. ábra Hógolyó sárgadinnye fajta 3-4 leveles hajtásai növekedésszabályozó anyagmentes MS táptalajra helyezve

Általában 6-7 hét elteltével három-négy leveles növényeket kaptunk (**35. ábra**). A megfelelően differenciálódott leveles hajtásokat leválasztottuk, majd növekedésszabályozó anyagmentes MS táptalajra helyeztük. Általában a letett hajtások 70 %-a meggyökeresedett (**36. ábra**). A megfelelő mértékű gyökérképződést követően a növényeket steril tőzeg-föld (1:1) keverékébe ültettük át. Az akklimatizálás 100 % relatív páratartalom mellett, $25 \pm 1^\circ\text{C}$ -on történt. A megerősödött palántákat edzés után üvegházba ültettük ki (**37. ábra**).



36. ábra Hógolyó sárgadinnye fajta gyökeres hajtásai

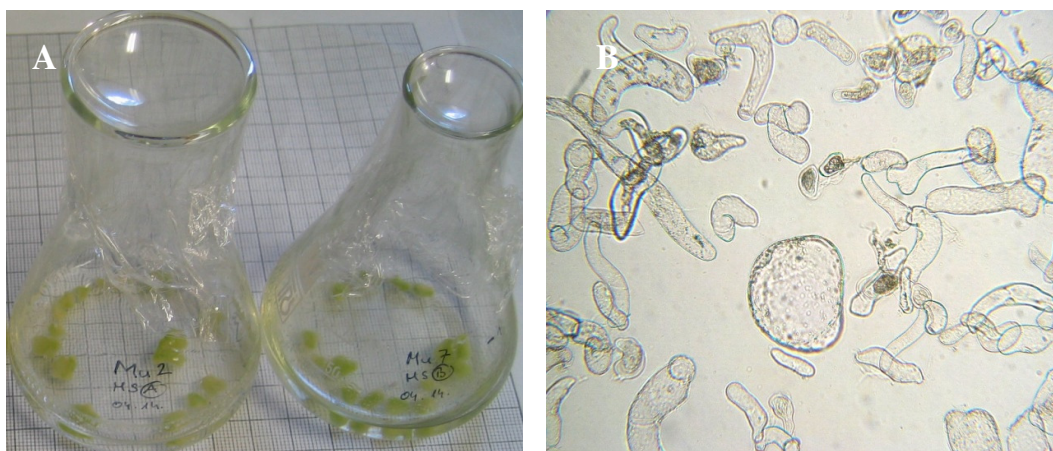


37. ábra Akklimatizáción átesett, cserépbe kiültetett regenerált növény (Hógolyó sárgadinnye fajta)

5.2.12. A sárgadinnye regeneráció jellegzetes fázisai folyékony táptalajon

Kísérleteink alapján egyértelművé vált, hogy a Muskotály fajtának a legjobb a válaszadó képessége a vizsgált fajták közül. A következő képeken az előbb említett fajta szomatikus embriogenezissel létrejött regeneránsainak fejlődési lépéseit mutatjuk meg, MD13 táptalajon.

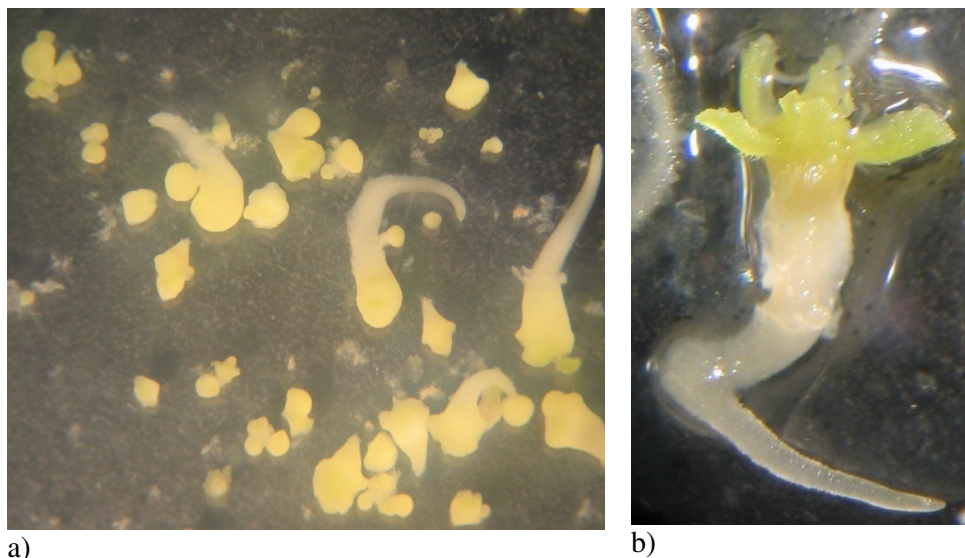
A kísérletek során érett magból indultunk ki. A megtisztított, fertőtlenített magokat 6 órára desztillált vízbe áztattuk, aminek hatására a magok vizet vettek fel, megduzzadtak, ezzel együtt beindult az enzimműködés, ami a száraz magokban minimálisra lassult. Az így előkészített magokat steril körülmények között feldaraboltuk. A darabolás során 1-4 mm²-es magdarabokat kapunk, számuk 12-16 között változott magonként. A feldarabolt mag részeit 100 ml-es Erlenmeyer lombikban rázógépre tettük. A magdarabok erőteljesen növekedésnek indultak, kizöldültek, széleiken enyhén begömbültek, a feldarabolt mag részeinek széléről leszakadó kallusz (embriógén) sejtek a folyadékban fejlődtek tovább (**38. ábra**).



38. ábra Muskotály sárgadinnye fajta folyékony MD13 táptalajon, 18 nap rázás után

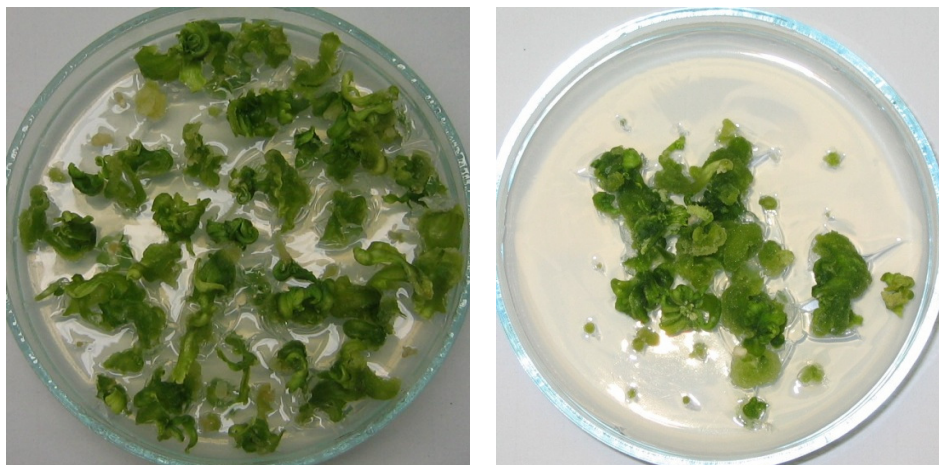
A) rázott tenyészetek B) leszakadó kallusz sejtek rázott tenyészetben,
fénymikroszkópos felvétel (40x-es nagyítás)

Az esetek jó részében a folyékony táptalajban szomatikus embriók képződtek, melyek egy része a folyadékban kezdett továbbfejlődni, de a legtöbb a szilárd táptalajra kerülés után átlagosan 1-2 hét elteltével kezdett differenciálódni. (**39. ábra**).



39. ábra Muskotály sárgadinnye fajta folyékony MD13 táptalajon, 34 nap ráztatás után (sztereomikroszkópos felvétel)

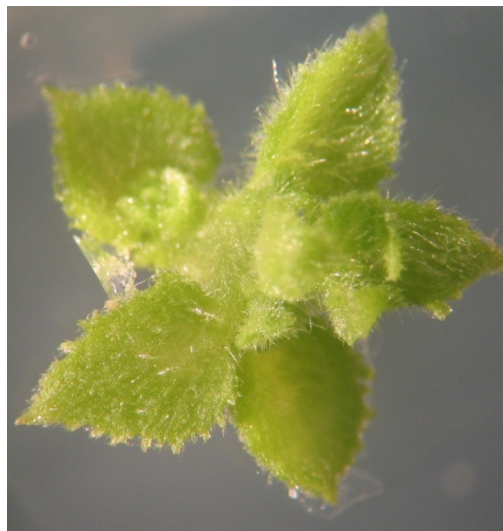
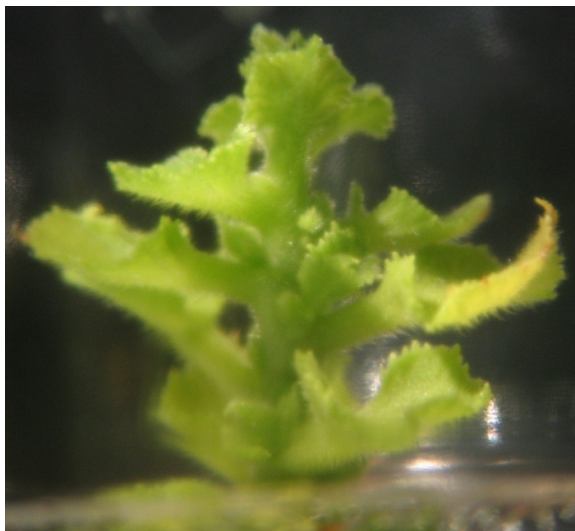
A szilárd táptalajra tett szomatikus embriók optimális esetben fejlődésnek indulnak. Az alábbi két képen (40. ábra) jól látszik, hogy az embriók között Petri-csészénként nagy eltérés mutatkozott. Az embriók nagy részéből növény fejlődött, egy részük azonban megállt a fejlődésben, majd egy idő után elsárgult. A fejlődésben megállt embriók egy másik része elkalluszosodott.



40. ábra Muskotály sárgadinnye fajta 75 napos tenyésztése, szilárd MS táptalajon. (Indukciós idő 43 nap, MD13 táptalajon.)

Általában 7-8 héttel a szilárd, növekedésszabályozó anyag mentes táptalajra helyezés után legalább három-négy leveles, gyökeres növényeket kaptunk (41. ábra). A gyökérképződéshez nem volt szükségünk külön indukcióra, az esetek legnagyobb részében a gyökér a hajtással egy időben fejlődött ki. Amikor a növények elérték a megfelelő méretet,

steril tőzeg-föld (1:1) keverékébe ültették át őket. Az inkubálás 100% relatív páratartalom mellett, $25\pm 1^\circ\text{C}$ -on történt. A megerősödött palántákat edzés után üvegházba ültették ki.



41. ábra Muskotály fajtájú szomatikus embriogenezisen keresztül regenerált sárgadinnye növény 200 ml-es tenyészedényben, MS táptalajon, 50 nappal a szilárd táptalajra kerülés után. (Indukciós idő 43 nap, MD13 táptalajon.)

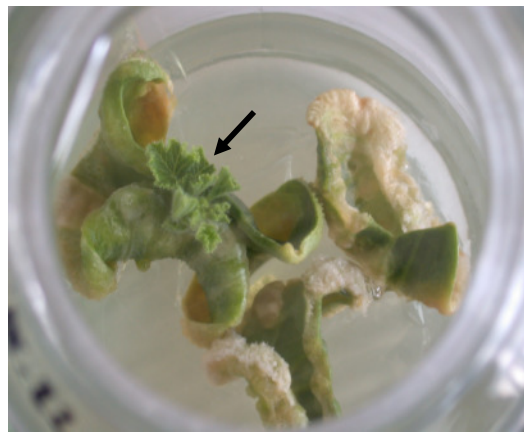
A képződött növények azonban nem voltak egyenértékűek, a táptalajok mindegyikén előfordult néhány rendellenes növény. Egy részük az első két levél kifejlődése után megállt a fejlődésben, közülük számos egyed a későbbi passzálások során egyre üvegeesebbé vált, majd egy idő után elsárgult. Másik részük viszont egy-két héten belül túlnőtte az első torz leveleket és egészséges, kiültetésre alkalmas növénné fejlődött.

5.2.13. A tökfélék regenerációjának jellegzetes fázisai szilárd táptalajon

Kísérleteink során mindhárom vizsgált tök fajtán megfigyeltünk regenerációt, mely a levélnyel közvetlen közelében történt. A sziklevéldarabok regenerációs táptalajra helyezése után egy héttel már megfigyelhető volt a kalluszcsomok kialakulása és további 1-2 héttel később megjelentek az első hajtáskezdemények is (**42. ábra**).



42. ábra Hajtáskezdemény (Hk) 7 nappal a leoltás után 1 mg/l BA és 0.1 mg/l IES növekedésszabályozó anyag tartalmú táptalajon, Nagydobosi sütőtök fajtán

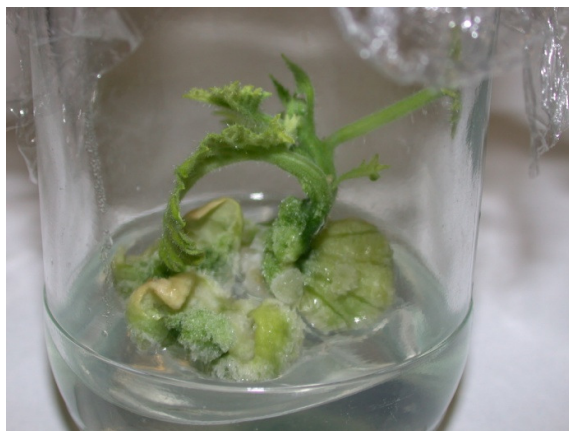


43. ábra Regenerált hajtás 9 nappal a leoltás után, 1 mg/l BA és 0.1 mg/l IES tartalmú táptalajon (Nagydobosi sütőtök fajtá)

A növények gyorsan fejlődtek, további 1-2 hét múlva már elkülöníthetők voltak a szervek, jól láthatóvá vált a levél és a szár (**43. ábra**).

A hajtások minden esetben organogenezissel képződtek, a gyökeresedést külön táptalajon kellett indukálni. A képződött hajtások átlagosan 4-5 hét után elérték azt a méretet, hogy leválaszthattuk őket a kalluszcsonóról és átkerülhettek gyökereztető táptalajra. A **44. ábra** egy leválasztás előtt álló patisszon hajtást mutat.

A gyökér nélküli hajtásokat 0.5 mg/l indolecetsavat tartalmazó táptalajon gyökerezettük, de előfordult, hogy a gyökerek már regenerációs táptalajon kilakultak (**45. ábra**). Ez elsősorban cukkíni esetében (a képződött hajtások 28 %-a) volt gyakori.



44. ábra. Regenerált hajtás, közvetlenül a gyökereztető táptalajra helyezés előtt. (Óvári fehér patisszon fajta)



45. ábra MT7 regenerációs táptalajon járulékos gyökereket fejlesztő Black Beauty cukkíni fajta

Miután gyökereztető táptalajra kerültek, a növények egy része megállt a fejlődésben, ám azok, amelyek gyökeret fejlesztettek ismét gyors növekedésnek indultak. A megfelelő mértékű gyökérképződést követően a növényeket steril tőzeg-föld (1:1) keverékébe ültetve inkubáltuk. A megerősödött palántákat edzés után üvegházba ültettük ki (**46. ábra**).



46. ábra Regeneráns sütőtök palánta kiültetés után

5.3. Az antibiotikumokkal szembeni érzékenység tesztelése

5.3.1. Sárgadinnye fajták antibiotikum érzékenységének tesztelése

A transzformációs kísérletek megkezdése előtt teszteket végeztünk a sziklevelek antibiotikumokkal szembeni érzékenységnek megállapítására a Hógolyó és Hale's Best sárgadinnye fajták esetében.

Az *Agrobacterium* előlését célzó kísérletekben az A281-es törzzsel fertőzött Hógolyó sárgadinnye sziklevéldarabok MDOP1 regenerációs táptalajon 500 mg/l augmentin tartalom mellett még hoztak hajtásokat, de az *Agrobacterium* nem szaporodott el nagy mértékben a sziklevelek körül. A szelekciós ágens koncentrációjának meghatározásakor az MDOP1 regenerációs táptalajokon vizsgált sziklevéldarabokon 4mg/l glufozinát tartalom mellett már nem regenerálódtak hajtások a Hógolyó sárgadinnye fajta esetében.

Az LBA4404-es törzzsel fertőzött Hógolyó (MDOP1) és Hale's Best (MDOP2) fajta sziklevéldarabjain csak kis mértékben csökkent a regeneráció, ha a regenerációs táptalajok 500 mg/l cefotaximot vagy 700 mg/l carbenicillint tartalmaztak. A szelekciós antibiotikum koncentrációjának meghatározása esetén az LBA4404-es törzzsel fertőzött sziklevéldarabokon az MDOP1 és MDOP2 táptalajon 100 mg/l kanamicin tartalom mellett nem történt hajtásregeneráció sem a Hógolyó, sem a Hale's Best fajta esetében. A sziklevéldarabok elkezdtek kalluszosodni, de pár hét elteltével elsárgultak, majd elhaltak 100 mg/l kanamicin koncentráció felett. A kalluszosodott sziklevéldarabok nem hoztak hajtáskezdeményeket egyik fajta esetében sem.

18. táblázat A sziklevéldarabok antibiotikum túrésének tesztelése sárgadinnye esetében (Hógolyó és Hale's Best) +: A sziklevéldarabon regenerálódtak hajtások
–: A sziklevéldarabon nem történt regeneráció

Felhasznált antibiotikumok	Koncentráció (mg/l)										
	0	100	200	300	400	500	600	700	800	900	1000
augmentin	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–
cefotaxim	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–
carbenicillin	+	+	+	+	+	+	+	+	–	–	–
kanamicin	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

5.3.2. Tök fajták antibiotikum érzékenységének tesztelése

A sütőtök sziklevéldarabokat eltérő koncentrációjú cefotaximot és kanamicint tartalmazó táptalajokra helyeztük. Eredményül azt kaptuk, hogy 500 mg/l a legnagyobb olyan cefotaxim koncentráció, amely még nem gátolja a növényregenerációt, ezért az *Agrobacterium*-mal történő együtt-tenyésztés után a baktérium előléséhez ezt a koncentrációt használtuk. A kanamicin esetében ellenben azt a koncentrációt kerestük, amely már gátolja a regenerációt, hogy csak a transzformáns, kanamicin rezisztens sejtek maradjanak életben. Ehhez a 100 mg/l kanamicin hozzáadása bizonyult a legmegfelelőbbnek, melyet szintén csak a kokultiváció utáni táptalajokhoz adtunk.

5.4. A transzformációs kísérletek eredményei

5.4.1. Sárgadinnye transzformáció

5.4.1.1. A transzformáció lépéseinek körülményei

A Hógolyó és a Hale's Best fajta transzformációját a 4.2.7. fejezetben leírt módon (Qiu et al., 1999) végeztük, kisebb módosításokkal. Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy a transzformáció eredményességét számos tényező befolyásolja. Az általunk vizsgált tényezőket és ezek hatását az alábbiakban csoportosítottuk:

A fertőzőskori **baktérium szuszpenzió koncentrációja** jelentősen befolyásolta, milyen mértékben fertőződtek be a sziklevéldarabok. Az általunk végzett kísérletek alapján az $OD_{600} = 0.8 - 1$ közötti értékű baktérium szuszpenzió bizonyult a legmegfelelőbbnek a fertőzéshez, mert töményebb szuszpenzió alkalmazásakor a baktérium előlése nem volt lehetséges.

A **fertőzés időtartama** volt a következő tényező, amelynek szerepét vizsgáltuk sziklevéldarabok baktérium szuszpenzióban történő áztatásának során. Úgy találtuk, hogy az általunk alkalmazott antibiotikum koncentráció mellett, – amely a növényi regenerációt még nem gátolta – 5 perces fertőzési idő volt a legmegfelelőbb. Amennyiben 5 percnél hosszabb fertőzési idővel dolgoztunk, a hajtásregeneráció hatékonysága lecsökkent. A 10 perces fertőzés esetén még elkezdtek kalluszosodni a sziklevéldarabok és meg is jelentek hajtáskezdemények, azonban egy idő után elbarnultak, mintha megégtek volna. A 20 perces vagy a feletti fertőzési időtartam esetén az időtartam növekedésével fordítottan arányosan a sziklevéldarabok egyre kevésbé növekedtek, gyakran a táptalaj antibiotikum tartalma sem bizonyult elegendőnek a baktérium előléséhez. A baktérium elszaporodott a táptalajon és a

sziklevéldarabok elpusztultak. A 60 perces fertőzés esetén a sziklevéldarabok eredeti feldarabolás-kori méretűek maradtak, elsárgultak és elhaltak.

Az **együtt-tenyésztés** időtartamok közül a 2 nap elegendőnek bizonyult a transzformációra. Ha 3 vagy annál több napig történt a kokultiváció, akkor a későbbiekben gondot okozott a baktérium előlése abban az esetben is, ha az antibiotikum koncentrációt tovább növeltük. Továbbá megfigyeltük, hogy a fertőzött szikleveleken sokkal kevesebb hajtáskezdemény fejlődött, mint a kontroll regeneráns sziklevéldarabokkal. Az antibiotikum koncentráció növelésének hatására gyakrabban előfordult hogy egy része a szikleveleknek teljesen elkalluszosodott.

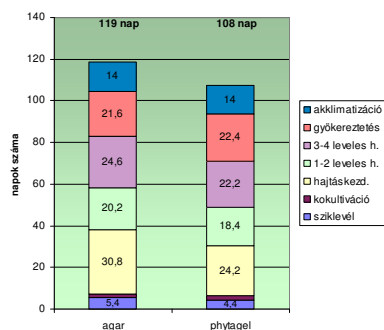
A sziklevéldarabokat 10-14 naponta friss szelekciós-regenerációs táptalajokra helyeztük át, mivel a táptalaj antibiotikum tartalma viszonylag gyorsan lebomlott. A gyakori átoltással tudtuk kiküszöbölni a tenyészetek befertőződését.

A kísérletek eredményeként szelekciós táptalajon sikeresen felneveltünk növényeket. A Hógolyó fajtából összesen 6272 sziklevéldarabot transzformáltunk, ebből 206 gyökeres regeneráns növényt szelektáltunk, a transzformáció utáni regeneráció hatékonysága a szelektív táptalajon sziklevéldarabra nézve 0.032 volt. A Hale's Best fajtából összesen 12000 sziklevéldarabot transzformáltunk, ebből 230 gyökeres regeneráns növényt szelektáltunk, egy sziklevéldarabon átlagosan 0.02 gyökeres regeneránst tudtunk felnevelni.

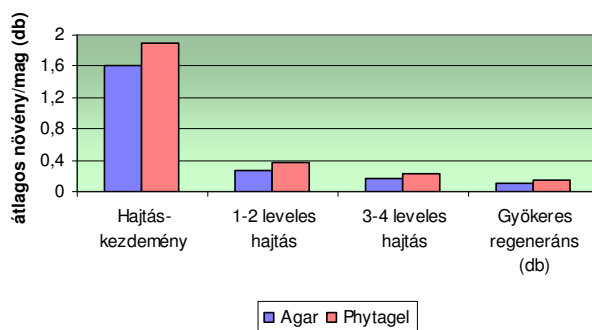
Ha a szelekciós táptalajra helyeztük a kontroll nem transzformáns növényeket, akkor azok egy-két hét alatt kifehéredtek és elpusztultak, míg a vélhetően transzformáns növények tovább fejlődtek. Ugyanakkor a regeneráció hatékonysága erősen lecsökkent mindkét fajta esetében. A PCR módszerrel a ZMVY CP gént nem sikerült kimutatnunk.

5.4.1.2. Agar és phytagel bázisú táptalajok összehasonlítása a transzformáció hatékonyságának szempontjából

Az **agaron** illetve **phytagelen** történt valószínűleg transzformáns növények regenerációja között már nem volt olyan nagy az eltérés a napok számában, mint a regeneráció esetén. Az agaron regenerálódott transzformánsok 11 nappal később érték el kiültetett cserepes fázist. (**47. ábra**) A variancia analízis lefuttatva a két mintás t-próba és a Welch-féle próba is szignifikánsan eltérőnek mutatta a nevelési idő hosszát agar illetve phytagel tartalmú táptalajon. A kétféle táptalajon (agar, phytagel) felnevelt gyökeres regeneránsok számát összehasonlítva egy magra vonatkoztatva (**48. ábra**) az egyszempontos varianciaanalízis nem mutat szignifikáns eltérést, 5 %-os szignifikancia szinten. (9.3.15. melléklet)



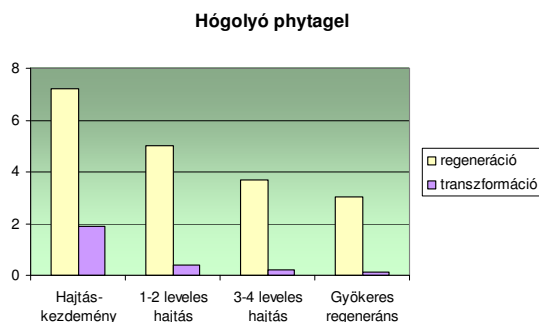
47. ábra Egy kiültetett Hógolyó sárgadinnye fajta vélhetően transzformáns felneveléséhez szükséges átlagos időtartam agar illetve phytagel bázisú táptalajon



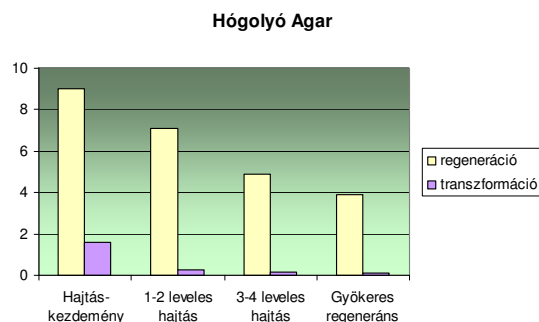
48. ábra Hógolyó transzformáció hatékonyságának összehasonlítása agar és phytagel bázisú táptalajokon, a különböző fejlődési fázisokban.

5.4.1.3. A regeneráció és a transzformáció hatékonyságának összehasonlítása

A transzformációs eljárás drasztikusan csökkentette mind a regenerálódó hajtáskezdemények, mind felnevelhető növények számát. Míg a regeneráció során átlagosan magonként a Hógolyó fajta esetében 10,5, a HB esetében 8 hajtáskezdeményt kaptunk, *Agrobacterium* fertőzés után a hajtáskezdemények magonkénti száma 1,9-re illetve 1-re esett vissza (**49. ábra** és **50. ábra**). Természetesen előzetesen már értékeltük a növények szelekciós ágens tűrőképességét, és meghatároztuk azokat a koncentrációkat, melyek alkalmazása esetén az sziklevéldarabokból az indukciós táptalajon nem tudtak hajtáskezdemények fejlődni, valamint a későbbi fázisban levő növények is elpusztultak. A fajták között azonban tűrőképességben jelentős eltérés mutatkozott, mivel a vad típusúnak tekinthető tájfajtából kisselektált Hógolyó fajta magasabb antibiotikumtűrő-képességgel rendelkezett. Természetesen a sziklevéldaraboknál alkalmazott antibiotikum koncentrációknál a kontroll növények közül egyetlen esetben sem tudtunk növényt regenerálni.



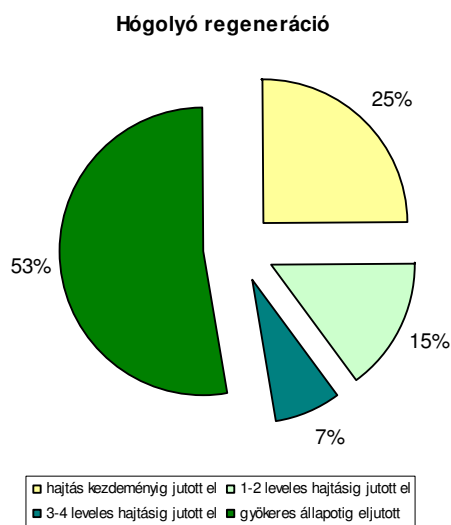
49. ábra Hógolyó sárgadinnye fajta regeneránsainak és vélhetően transzformáns növényeinek átlagos száma, a különböző fejlődési fázisokban



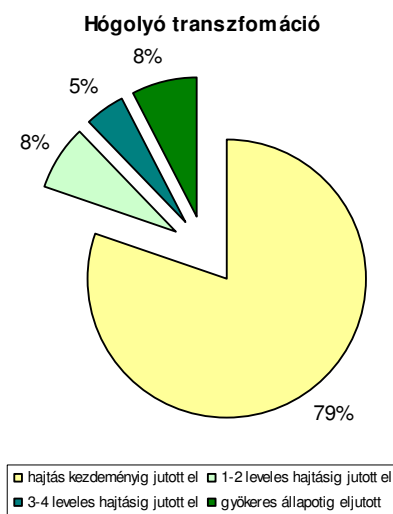
50. ábra Hale's Best sárgadinnye fajta regeneránsok és vélhetően transzformáns növények átlagos száma, a különböző fejlődési fázisokban

A regeneráció hatékonysága, mind az egyszerű regenerációs rendszerben, mind a transzformációs rendszerben fokozatosan csökken. Ez alatt értjük, hogy a kiinduláskor kapott hajtáskezdeményeknek csak egy része jutott el a leveles hajtás fázisig.

A kördiagramokon 100 %-nak ábrázoltuk az indukciós táptalajon megjelenő hajtáskezdemények számát. Hógolyó fajta regenerációjának esetében a hajtáskezdemények 53 %-a fejlődött gyökeres növénné, míg a fennmaradó 47 % a fejlődés valamely fázisában megállt, az **51. ábra** látható arányban (25 % hajtáskezdemény, 15 % 1-2 leveles hajtás, 7 % 3-4 leveles hajtás). Ugyanezt megvizsgáltuk a transzformáció esetében is (**52. ábra**). Ebben az esetben a hajtáskezdemények 8 %-a fejlődött gyökeres növénné, míg a 79 % hajtáskezdemény állapotban, 8 % 1-2 leveles fázisban, 5 % 3-4 leveles fázisban leállt a fejlődésben.

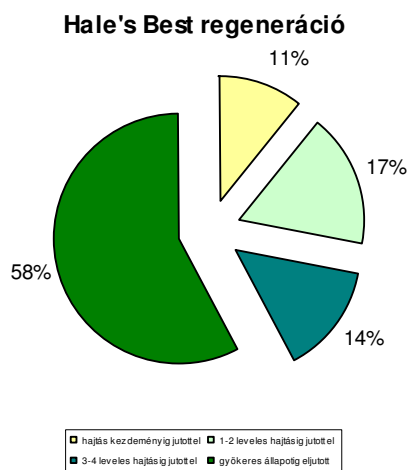


51. ábra Hógolyó fajtán regeneráció során keletkezett hajtáskezdemények, az elért legmagasabb fejlettségi szinten.

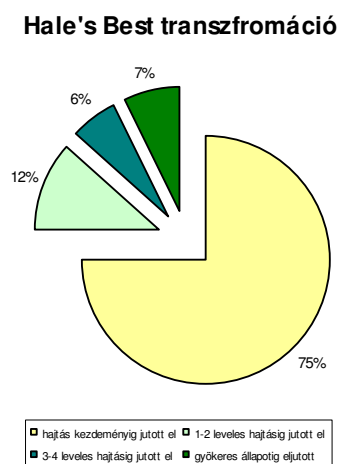


52. ábra Hógolyó fajtán keletkezett hajtáskezdemények, transzformáció esetén, az elért legmagasabb fejlettségi szinten.

A Hale's Best fajta regenerációjának esetében a hajtáskezdemények 58%-a fejlődött gyökeres növényvé, míg a fennmaradó 42 % a fejlődés valamely fázisában megállt, az **53. ábra** látható arányban (11 % hajtáskezdemény, 17 % 1-2 leveles hajtás, 14 % 3-4 leveles hajtás). Ugyanezt megvizsgáltuk a transzformáció esetében is (**54. ábra**). Ebben az esetben a hajtáskezdemények 7 %-a fejlődött gyökeres növényvé, míg a 75 % hajtáskezdemény állapotban, 12 % 1-2 leveles fázisban, 6 % 3-4 leveles fázisban leállt a fejlődésben.



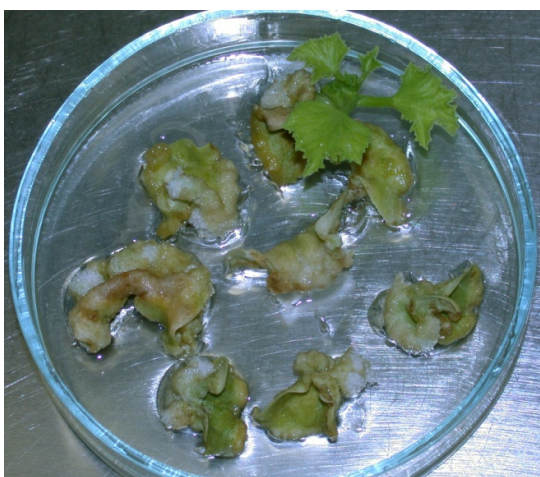
53. ábra Hale's Best fajtán regeneráció során keletkezett hajtáskezdemények, az elért legmagasabb fejlettségi szinten.



54. ábra Hale's Best fajtán keletkezett hajtáskezdemények, transzformáció esetén, az elért legmagasabb fejlettségi szinten.

5.4.1.4. A transzformáció jellegzetes fázisai Hale's Best sárgadinnye fajtán

Az alábbi felvételeken a Hale's Best fajta transzformációjának lépéseit mutatjuk be. Az *Agrobacterium*mal transzformált sziklevéldarabokat az együtt-tenyésztést követően MDOP2 szelekciós táptalajra tettük. Átlagosan 1-2 hét elteltével megjelentek az első hajtáskezdemények. Ezen hajtáskezdemények egy része 1-2 leveles hajtássá fejlődött, további két hét elteltével. Az 1-2 leveles hajtásokból átlagosan a 8. hétre 3-4 leveles hajtások fejlődtek (**55. ábra**). Ugyanerre a táptalajra letett kontroll sziklevéldarabokon az első hetekben fehér kallusz képződése mellett esetenként hajtáskezdemények jelentek meg, azonban ezekből soha sem regenerálódott hajtás. (**56. ábra**)



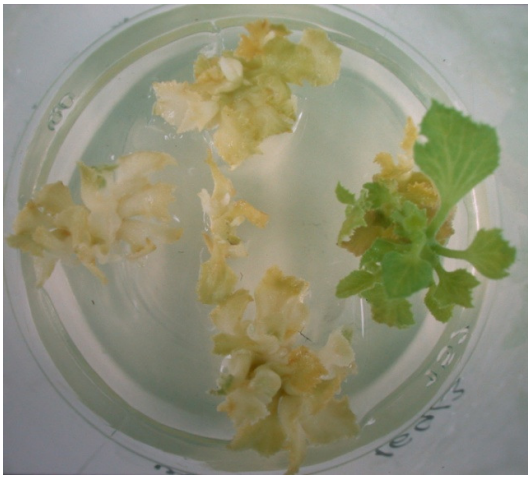
55. ábra Hale's Best sárgadinnye fajta 3-4 leveles vélhetően transzformáns sárgadinnye MDOP2 regenerációs és szelekciós táptalajon



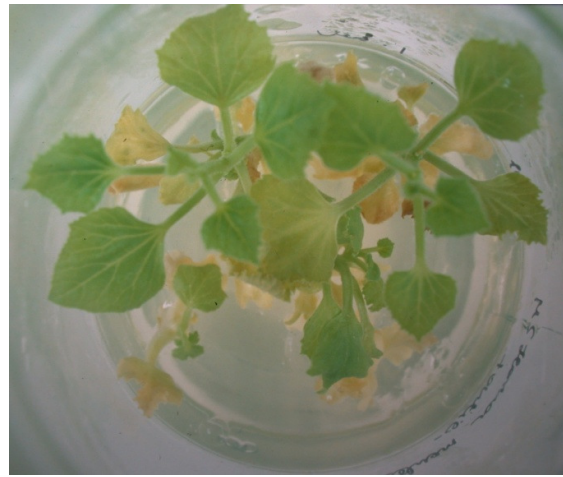
56. ábra Hale's Best sárgadinnye fajta kontroll sziklevéldarabok a MDOP2 regenerációs és szelekciós táptalajon.

A 3-4 leveles hajtáskezdemények esetében végeztünk egy kísérletet, amelyben azt kívántuk ellenőrizni, hogy a szelekciós táptalajon a nem-transzformáns növények valóban elpusztulnak-e. Ennek bizonyítására egymás mellé ültettünk egy vélhetően transzformáns és 4 kontroll növényt MDOP2 szelekciós táptalajra. Az **57. ábra** jól látható, hogy a jobb oldalon levő zöld a nagy valószínűséggel transzformáns növény tovább fejlődött és újabb leveleket hozott, míg a kontroll növények fejlődése leállt, a kanamicin hatására leveleik kifehéredtek.

A 3-4 leveles hajtásokat gyökereztető szelekciós táptalajra helyeztük, ahol néhány hét elteltével a gyökérképződés mellett újabb leveleket hoztak (**58. ábra**).

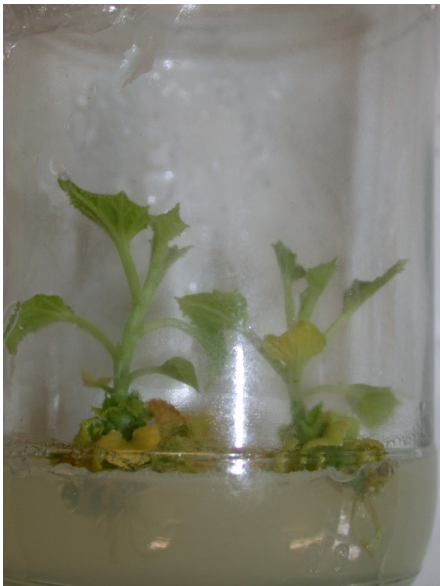


57. ábra Hale's Best sárgadinnye fajta feltehetően transzformáns és kifehéredett kontroll növények MDOP2 regenerációs és szelekciós táptalajon



58. ábra Hale's Best sárgadinnye fajta feltehetően transzformáns növények a gyökereztető táptalajon

A megfelelően gyökeres növényeket (**59. ábra**) két hetes akklimatizációt követően kiültettük üvegházba (**60. ábra**).



59. ábra Hale's Best sárgadinnye fajta meggyökeresedett nagy valószínűséggel transzformáns növény növekedésszabályozó anyag mentes szelekciós táptalajon



60. ábra Vélhetően transzformáns cserepes növény (Hale's Best sárgadinnye fajta)

5.4.1.5. A Hógolyó sárgadinnye fajta transzformációjának jellegzetes fázisai

Hógolyó fajta esetében a transzformációt a Hale's Best fajtánál leírt módon végeztük el és az alábbi felvételeken mutatjuk be. Az *Agrobacterium*mal transzformált sziklevéldarabokat a kokultivációt követően MDOP1 szelekciós táptalajra tettük. Átlagosan 1-2 hét elteltével megjelentek az első hajtáskezdemények. Ezen hajtáskezdemények egy része 1-2 leveles hajtássá fejlődött, további két hét elteltével. Az 1-2 leveles hajtásokból átlagosan a 8. hétre 3-4 leveles hajtások fejlődtek (**61. ábra**). Ugyanerre a táptalajra letett kontroll sziklevéldarabokon az első hetekben kemény kalluszcéteg képződött, amelyben zöld góccokat figyeltünk meg, de teljes növény soha nem fejlődött ezen a táptalajon (**62. ábra**).



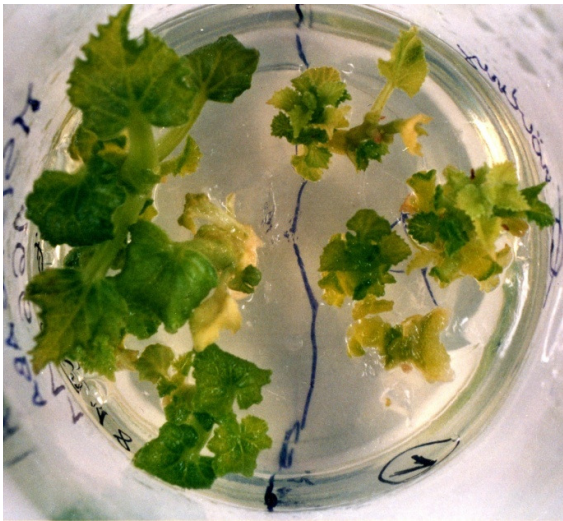
61. ábra Hógolyó sárgadinnye fajta 3-4 leveles feltehetően transzformáns sárgadinnye MDOP1 regenerációs és szelekciós táptalajon



62. ábra Hógolyó sárgadinnye fajta kontroll sziklevéldarabok MDOP1 regenerációs és szelekciós táptalajon.

A 3-4 leveles hajtáskezdemények esetében végeztünk egy kísérletet, amelyben azt kívántuk ellenőrizni, hogy a szelekciós táptalajon a nem-transzformáns növények valóban elpusztulnak-e. Ennek bizonyítására egymás mellé ültettünk feltehetően transzformáns és kontroll növényeket MDOP1 szelekciós táptalajra. A **63. ábra** jól látható, hogy a bal oldalon levő zöld nagy valószínűséggel transzformáns növények tovább fejlődtek és újabb leveleket hoztak, míg a kontroll növények fejlődése leállt, de a kanamicin hatására a leveleik kevésbé fakultak ki.

A 3-4 leveles hajtásokat gyökereztető szelekciós táptalajra helyeztük, ahol néhány hét elteltével a gyökérképződés mellett újabb leveleket hoztak (**64. ábra**). A megfelelően gyökeres növényeket két hetes akklimatizációt követően kiültettük üvegházba.



63. ábra Hógolyó sárgadinnye fajta feltehetően transzformáns és növekedésben lemaradt kontroll növények MDOP1 regenerációs és szelekciós táptalajon



64. ábra Feltételezhetően transzformáns növények gyökereztető táptalajon (Hógolyó sárgadinnye fajta)

5.4.2. Sütőtök transzformációs kísérletek

Mivel a regenerációs kísérletekben a sütőtök eltérő körülmények között is jó válaszadó képességűnek bizonyult, ezért úgy gondoltuk, hogy a sütőtök viseli el legjobban a transzformációval járó stressz hatásokat (antibiotikumok, *Agrobacterium*mal való fertőzés). Mindezek miatt a transzformációs kísérleteket csak a sütőtökkel végeztük el.

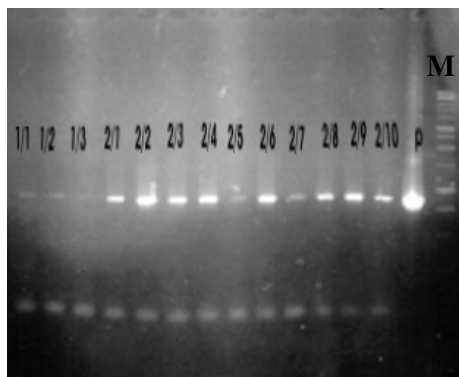
A fertőzés során a sziklevéldarabokat eltérő ideig tartottuk a baktérium szuszpenzióban és különböző kokultivációs időket alkalmaztunk. A sziklevelek már a legrövidebb (1 perc) fertőzési idő alatt is megfertőződtek de úgy találtuk, hogy a kokultivációs idő jelentősebb szerepet játszik a fertőzés eredményessége szempontjából.

Alacsony kokultivációs idő (1 nap) megkönnyítette az *Agrobacterium* előlését, de vélhetően kevesebb volt a transzformált sejtek száma is. Ezt a kevesebb regeneráns (feltehetőleg kanamicin rezisztens) megjelenésén mérhettük le. Egy napos együtt tenyésztés után a sziklevelek 17 %-án képződtek regeneránsok, míg a három napos kokultiváció után a sziklevéldarabok 23 %-án figyeltünk meg regenerációt. Mivel az antibiotikumok, viszonylag gyorsan lebomlottak, a sziklevéldarabokat 10-14 nap után friss szelekciós-regenerációs táptalajra helyeztük át.

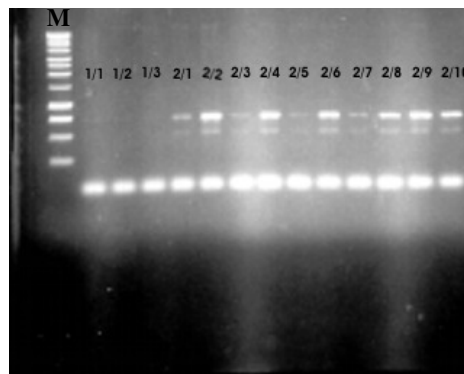
Azokat a hajtásokat, amelyek megfelelő méretet értek el a mintavételhez, egyesével szétültettük antibiotikumokat is tartalmazó gyökereztető táptalajra. Egy-egy levelet leszedtünk róluk és elvégeztük a DNS kivonást majd PCR technikával vizsgáltuk, hogy

sikerült-e előlni az *Agrobacterium*ot és, hogy tartalmazzák-e a növények a baktériumot illetve a génkonstrukciót.

A **65. ábra** és **66. ábra** az agaróz gélelektroforézis eredményeként kapott képet mutatja.



65. ábra A génkonstrukció jelenlétét vizsgáló agaróz gélelektroforézis eredménye (M-marker gén)



66. ábra Az *Agrobacterium* jelenlétét vizsgáló agaróz gélelektroforézis eredménye (M-marker gén)

A **65. ábra** látható, hogy mind a tizenhárom minta tartalmazza a bevitt gént. Azonban nem lehettünk benne biztosak, hogy a gén beépült a növény genomjába csak abban, hogy a vizsgált DNS tartalmazta az adott gént.

Hogy kizárjuk annak a lehetőségét, hogy a gén beépülését célzó vizsgálatok az *Agrobacterium* génjét mutatták ki megvizsgáltuk hogy tartalmazzák-e a vizsgált DNS-ek a baktérium DNS-ét. A **66. ábra** látható, hogy mind a tizenhárom növény, amit megvizsgáltunk fertőzött volt *Agrobacterium*mal. Balról az első három mintát (1/1, 1/2, 1/3) olyan növényekről szedtük, amelyeknél csak egy napig tartott a kokultiváció. Ezek a minták csak kis mértékben voltak fertőzöttek, az *Agrobacterium* jelenlétét jelző csík csak egészen halványan látható. A többi tíz minta esetében a kokultiváció három napig tartott, ezek a növények eltérő mértékű fertőzöttséget mutattak, de mindegyik erőbben fertőződött, mint az 1/1, 1/2, 1/3-as minták.

A kisebb fertőzöttséget mutató növények között találtunk négyet (1/1, 1/2, 3/1, 3/3), amelyeknél a bevitt gén jelenléte erőbben látszott, mint a baktériumé. Ezeknél a növényeknél feltételezhetjük, hogy sikeres volt a transzformáció. A transzformált növények közül egyelőre egyet sem sikerült teljesen felnevelni, a baktérium előlése véget a növényeket továbbra is antibiotikus táptalajon neveljük.

A **67. ábra** és **68. ábra** az *Agrobacterium*mal nagymértékben fertőzött 2/4-es és a csak kis mértékben fertőzött 2/3-as növényt mutatja. A két növény fertőzöttsége közötti különbséget a gélelektroforézis (**66. ábra**) is kimutatta.



67. ábra Az *Agrobacterium* fertőzés miatt elhaló levél a 2/4 jelzésű sütőtök növényen



68. ábra A csak enyhén fertőzött 2/3-as sárguló növény, amelyen nem láthatók az *Agrobacterium* fertőzés tünetei.

5.5. Új tudományos eredmények

A dolgozat egyik célja magyar sárgadinnyefajták és három tökféle *in vitro* regenerációja, és ezzel egy biotechnológiai felhasználásra alkalmas *in vitro* regenerációs rendszer felállítása. A másodlagos cél pedig ezen regenerációs technikák alkalmazásával a növényi transzformáció optimalizálása.

Sárgadinnye esetében elért eredmények

1. Elsőként sikerült a Javított Zentai, Muskotály, Tétényi csereshéjú és a Magyar kincs esetében növényt regenerálnunk *in vitro* körülmények között sziklevelekből kiindulva szilárd táptalajon.
2. Különböző növényi részek regenerációs képességét vizsgálva elsőként regeneráltunk növényt a Hógolyó és a Hale's Best fajták esetében hipokotilból és dekapitált hipokotilból szilárd táptalajon.
3. A növekedésszabályozó anyag optimalizációs kísérletek során a Hógolyó sárgadinnye fajta esetében a legtöbb átültetésre alkalmas hajtás a 0.9 mg/l benziladenin és 0.6 mg/l indolecetsav összetételű szilárd táptalajon (MDOP1), míg a Hale's Best sárgadinnye fajta esetében a 0.6 mg/l benziladenin és 0.9 mg/l indolecetsav összetételű szilárd táptalajon (MDOP2) fejlődött.
4. A magyar sárgadinnye fajták válaszadó képességét tesztelve folyadékkultúrában elsőként sikerült a Muskotály, a Hógolyó és az Ezüstananász fajták magjából szomatikus embriogenezis útján növényeket regenerálni.
5. Muskotály fajtával végzett növekedésszabályozó anyag optimalizációs kísérlet segítségével kiválasztottuk a megfelelő koncentrációt folyékony táptalajon (0.1 mg/l benziladenin és 2 mg/l 2,4-D).
6. A vizsgálat során felhasznált hatféle folyékony táptalaj összevetése alapján megállapítottuk, hogy a különböző alkalmazott vitaminok hozzáadása nem befolyásolta az embriogenezis indukcióját, a Muskotály, Hógolyó és Ezüstananász fajtáknál.
7. A folyékony táptalajokban alkalmazott különböző szénforrások hatását vizsgálva megállapítottuk, hogy a szacharózt tartalmazó táptalajok előnyösebbek a sárgadinnye embriogenezisének indukálása során (Muskotály és Hógolyó fajták).

8. Elsőként állapítottuk meg, hogy a sárgadinnye esetében az alacsony pH kedvezően befolyásolja a szomatikus embriogenezis indukálását, a magasabb pH pedig a növényé differenciálódást (Muskotály, Hógolyó és Ezüstananász fajták).
9. Muskotály fajtánál a magok életkorának hatását vizsgálva a szomatikus embriogenezisre megállapítottuk, hogy a fiatal magvakból indított tenyészetekből több növény nyerhető folyadékkultúrában.
10. A szelekciós táptalajon sikeresen felneveltünk növényeket, melyek mellé téve a kontroll növények bizonyítottan elpusztultak. A vélhetően transzformáns növényeket sikeresen meggyökereztettük szelekciós táptalajon (Hógolyó és a Hale's Best fajták). A kiültetett növények az üvegházban virágot hoztak.

A tök esetében elért eredmények

1. Elsőként sikerült a Nagydobosi sütőtök és az Óvári fehér patisszon esetében növényt regenerálnunk *in vitro* körülmények között szikleveleiből kiindulva.
2. A transzformációs kísérletek során sikerült regeneráns Nagydobosi sütőtök növényeket felnevelni a szelekciós táptalajon. A feltételezhetően transzformáns növényeket sikeresen meggyökereztettük szelekciós táptalajon, majd a kiültetett növények virágot is hoztak.

6. KÖVETKEZTETÉSEK

Amikor célul tűztük ki magyar fajták *in vitro* regenerációját és transzformációját, az irodalmi ismeretek alapján világossá vált, hogy megfelelő protokoll nem áll rendelkezésre és ennek megtalálásáig számos kérdést kell megválaszolni. Bár viszonylag sok publikáció jelent meg a kabakosok és ezen belül *Cucumis* nemzetség, főleg az uborka (*C. sativus*), és sárgadinnye (*C. melo*) regenerációjáról és transzformációjáról, azonban már jóval kevesebb a tökfélékről. A publikált eredmények nem mutattak fel egy olyan módszert sem, mely a kabakosokra általánosan alkalmazható lett volna. A fő cél általában, csak úgy mint a mi esetünkben is, egy hatékony *in vitro* regenerációs rendszer felállítása és erre alapozva transzformánsok létrehozása volt. Ezen cél érdekében végzett kísérletek azonban még elég alapvető kérdéseket boncoltak, többek között, hogy mely növényi rész legyen a kiindulási anyag, milyen legyen a táptalaj összetétele és a nevelési körülmények (Moreno et al., 1985; Kathal et al., 1988; Niedz et al., 1989; Gray et al., 1993). Nunez-Palenius és munkatársai szerint (2008) a legfontosabb tényező, amely a regeneráció sikerességét meghatározza a genotípus megválasztása. Ennek oka többek között a sárgadinnye fajták nagy morfológiai és genetikai változatossága. A kereskedelemben lévő fajták regenerációs képessége azonos körülmények között, ugyanazt a regenerációs módszert alkalmazva eléggé különböző (Gray et al., 1993; Ficcadenti és Rotino, 1995; Molina és Nuez, 1995a; Kintzios és Taravira, 1997; Galperin et al., 2003a). De néhány szerző szerint a regeneráció módja is genotípus függő. Oridate és munkatársai (1992), valamint Gray és munkatársai (1993) megállapították, hogy a *reticulatus* fajta típusba tartozó sárgadinnye fajták esetében gyakoribb volt a szomatikus embriogenezis, mint az *inodorus* fajta típusúak között. Ezen felül Oridate és munkatársai (1992) szignifikáns különbséget mutattak ki 18 megvizsgált kereskedelemben lévő fajta regenerációs képessége között. Gray és munkatársai (1993) pedig egy fajtára kidolgozott regenerációs módszert 51 kereskedelemben megtalálható fajtán tesztelték. A fajták válaszadó képessége sziklevéldarabonként 5-100% (0.1-20.2 embrió/sziklevéldarab) között változott. Ficcadenti és Rotino (1995) összesen 11 sárgadinnye fajtát (*reticulatus*, *inodorus*) vizsgáltak. Az organogenezis útján regenerált hajtások száma sziklevéldarabonként 6 és 17.3 között változott a *reticulatus* fajta típusba tartozó fajták esetében, míg az *inodorus* fajta típusok regenerációs képessége 12.2 és 14.2 (hajtás/sziklevéldarab) közötti eredményt hozott. A publikált eredmények ismételhetősége más laboratóriumokban, még a sikeres rendszereknél is bizonytalan. Ennek okai: a regenerációs képesség erős genotípus-függése a fajták között és a magtétéleken belül is, továbbá a hiányos értékelési mérési módszerek, a megfelelő statisztikai

feldolgozások hiánya és így a következtetések pontatlansága (Molina és Nuez, 1995b). A szerzők többsége egyetért abban, hogy a sziklevélből a legkönnyebb regenerálni (Gaba et al., 1996; Liborio-Stipp et al., 2001; Galperin et al., 2003a; Gaba et al., 2004; Nagesha et al., 2007). Az újabb kutatások bizonyították, hogy a hipokotil (Curuk et al., 2003) megbízhatóbb a diploid regeneránsok előállításánál a sziklevéllal szemben, ahol gyakori a poliploidok előfordulása (Ezura et al., 1992; Adelberg et al., 1994). Általánosan alkalmazott a benziladenin organogenezis indukálására (Debeaujon és Branchard, 1993; Adelberg et al., 1994). Az embriogén kultúrák indításánál bevált a 2,4-D szintetikus auxin használata (Tabei et al., 1991; Debeaujon és Branchard, 1993; Gray, 1996; Guis et al., 1997; Ezura és Akasaka-Kennedy, 2004).

Az irodalom és saját korábbi kísérleteink alapján is nyilvánvaló volt, hogy a regeneráció erős genotípus-függése miatt kicsi az esélye annak, hogy az irodalomban leírt bármely rendszer az új fajták esetében egyszerűen átvehető és hatékony legyen. Ezért kettős stratégiát alkalmaztunk, egyrészt az értékes magyar fajták közül többet is bevontunk a kísérletekbe, hogy az esetleges jó válaszadó genotípust megtaláljuk, illetve a regenerációs protokoll elemeit, elsősorban a táptalaj-összetételt és a növekedésszabályozók hatását elemeztük.

A munka azt a logikát követte, melyre a nemzetközi irodalom is utalt. A regenerációs rendszer lépéseit mint lehetőségi feltételeket sorrendbe állítottuk. Az egyes lépéseket, mint a következőhöz szükséges feltételt tekintve követtük.

6.1.1. Sárgadinnye szilárd táptalajon

Kísérleteinkben maghéjuktól megfosztott magokat használtunk, hasonlóan a nemzetközi gyakorlathoz, mivel a sárgadinnye magok gyakran maghéjon belül is fertőzöttek. A magfertőtlenítés protokollhoz több módszert is kipróbáltunk, melyek közül a mi esetünkben a 15 %-os Clorox használata vált be (**5. ábra**), mely összhangban van más szerzők eredményeivel (Yadav et al., 1996; Liborio-Stipp et al., 2001; Yalcin-Mendi et al., 2004). A Ficcadenti és Rotino (1995) által alkalmazott etil-alkohol nátrium-hipoklorittal kombinált fertőtlenítési módszer a magyar fajtáknál nem hozta meg a kívánt eredményt, mert az időtartam növelésével csökkentette a csírázási százalékot. A hidrogén - peroxid, szintén túl erős fertőtlenítő szernek bizonyult, hiszen a hámozott magok felszínét károsította, amely a csírázáskor szabad szemmel is látható szövetkárosodást okozott és fehér foltként jelent meg a szikleveleken. A többiek által eredményesen használt higany - klorid alkalmazását (Kathal et

al., 1988; Li et al., 1990) már az előkísérletek során elvetettük, mivel drasztikusan csökkentette a magok életképességét.

Az Amarillo Oro fajtánál sikeresen használt (IES és KIN tartalmú) MD1 táptalaj (Moreno et al., 1985) a magyar fajták esetében szikleveléből kiindulva nem volt hatékony. A Branchard és Chateau (1988b) által Cantaloup charentais fajtára kidolgozott (2,4-D és BA tartalmú MD2) táptalajon, melyen embriót és növényt tudtak regenerálni, a magyar fajták (Magyarkincs, Javított Zentai, Hógolyó, Tétényi csereshéjú), csak fehér kalluszt képeztek. Az NES és BA tartalmú MD3 táptalajon (Roustan et al., 1992) a Magyar kincs fajta sziklevelein zöld kallusz képződött, a többi fajta pedig fehér kalluszt hozott. Az MD4 táptalajon, melyen a Hale's Best fajta szikleveléből már sikeresen regeneráltak növényt (Niedz et al., 1989; Fang és Grumet, 1990), valamint az MD5 táptalajon (Bársony et al., 1999) – mely hasonló növekedésszabályozó anyag-összetételű – direkt organogén hajtásindukciót figyeltünk meg a sziklevéldarabok szélén a Hógolyó és a Hale's Best fajta esetében.

A kilenc fajta válaszdó képességét tesztelve az öt különböző szilárd táptalajon (MD6, MD7, MD8, MD9, MD10) megállapítottuk, hogy a Hógolyó, a Magyar kincs, a Javított Zentai és a Hale's Best fajták jó, míg a Tétényi csereshéjú fajta gyenge válaszdó képességgel rendelkezik. Az eredmények a fajták közötti nagyon eltérő válaszdó képességre és növekedésszabályozó anyag igényre utalnak, melyet a korábbi eredmények is alátámasztanak (Debeaujon és Branchard, 1993; Molina és Nuez, 1995a). Valamennyi táptalaj tartalmazott BA-t, mivel a BA különböző fajták esetében önmagában is elegendőnek bizonyult regeneráció indukálására (Kathal et al., 1988; Gaba et al., 1996, Liborio-Stipp et al., 2001). Kísérletünkben az 1 mg/l BA (MD10) és a 0.5 mg/l BA (MD9) tartalmú táptalajon a legtöbb fajta regenerációt mutatott. Az indukció után azonban a fejlődés több esetben is leállt. Auxin hozzáadása csak néhány fajtánál segítette az organogenezist, míg másoknál elnyomta. A 2,4-D-t tartalmazó táptalajon egyáltalán nem kaptunk regeneránsokat. Ficcadenti és Rotino (1995) BA (0.6 mg/l) és ABS (0.26 mg/l) hozzáadásával eredményesen regenerált növényt, míg anélkül, csak BA hozzáadásával szignifikánsan kevesebb hajtást kapott. Ez ellentmond annak a megállapításnak (Kathal et al., 1988; Gaba et al., 1996, Liborio-Stipp et al., 2001), hogy a BA önmagában is elegendő az organogén hajtásindukcióhoz. Ezért ezeket az eredményeket kombináltuk Niedz és munkatársai (1989) eredményével. Megemeltük a táptalajhoz hozzáadott IES mennyiségét, és meghagytuk az ABS-t (MD6 táptalaj). Ez volt az a táptalaj, melyen az összes vizsgált közegek közül a legtöbb növényt tudtuk regenerálni, a Hale's Best és a Hógolyó sárgadinnye fajtáknál. A Hale's Best regeneráló képességét más eredményekhez

hasonlóan mi is bizonyítottuk (Trulson és Shahin, 1986; Niedz, et al., 1989; Yadav et al., 1996).

A megfelelő növényi rész kiválasztására irányuló kísérleteinkben megállapítottuk, hogy a sziklevel a leghatékonyabb kiindulási anyag regeneráció szempontjából, mind a Hógolyó, mind a Hale's Best fajta esetében. Az eredmény megerősíti a sziklevel alkalmasságát a regenerációra, mint ahogy azt már több szerző leírta (Gaba et al., 1996; Liborio-Stipp et al., 2001; Galperin et al., 2003a; Gaba et al., 2004; Nagesha et al., 2007). A kiindulási növényanyag korát tekintve, azt tapasztaltuk – hasonlóan más szerzők eredményeihez (Niedz et al., 1989; Ficcadenti és Rotino 1995; Gaba et al., 1996; Ben Amor et al. 1998; Curuk et al., 2003) –, hogy a négy-öt napos csíranövények leválasztott szikleveleiből nyerhető a legtöbb regeneráns növény.

Sokan nem is vizsgálják (vagy nem közlik le) hogy a felhasznált növényi részek életkorának van-e hatása a regenerációra, hanem más tanulmányok eredményeire támaszkodva megállapítanak egy ideális csíranövény életkort vagy csak egy időintervallumot adnak meg és szövegesen magyarázzák milyen fejlettségi állapotú az a növényi rész amelyet végül felhasználtak. Ezek a tanulmányok más változókat hasonlítanak össze kísérleteikben, mint például Ficcadenti és Rotino (1995) csak 4-5 napos szikleveleket használnak kísérleteik során, de vizsgálták az alaptáptalaj, különböző genotípusok, három különböző növekedésszabályozó anyag és a szilárdító közeg (agar vagy phytagel) hatását a regeneráció hatékonyságára.

Szakirodalmi adatokkal megegyezik az az eredményünk, hogy a hipokotil szintén alkalmas kiindulási anyagnak, de hatékonysága kisebb a sziklevelhez viszonyítva. Hipokotilból kiindulva Hale's Best és Hógolyó fajtákból sikeresen regeneráltunk növényeket. Hipokotilból kiinduló regenerációval többen is próbálkoztak sikertelenül, Moreno és munkatársai (1985) egyáltalán nem tudtak növényeket regenerálni, míg Blackmon és munkatársai (1981) csak embriókat tudtak indukálni.

Lomblevelből kiindulva a vizsgált Hógolyó és Hale's Best fajtáknál nem tudtunk hajtást regenerálni, szemben az irodalomban szereplő fajtákkal (Kathal et al., 1988; Tabei et al., 1991).

Elsőként próbáltuk ki a tojásgyümölcsnél leírt hipokotil dekapitációs módszert (Fári et.al., 1995) a Hógolyó és Hale's Best sárgadinnye fajtáknál. Elsőként tudtunk a hipokotil vágási felületén hajtásokat regenerálni sárgadinnye esetében, átlagosan minden második magból kiindulva növényt kaptunk. Ez az eredmény azonban gyengébb a sziklevelnél tapasztalttal szemben. **(8. ábra, 9. ábra)**

A két kiválasztott fajta esetében BA és IES 25 különböző kombinációból álló növekedésszabályozó anyag optimalizációs kísérletet végeztünk. A legtöbb szerző csak egyszerű növekedésszabályozó anyag sorokon vizsgálta az adott fajtákat (Liborio-Stipp et al. 2001), vagy csak egy növekedésszabályozó anyag-összetételt teszteltek (Molina és Nuez, 1995a), komplex növekedésszabályozó anyag optimalizációs vizsgálatokat csak kevesen végeztek (Moreno et al., 1985; Roustan et al., 1992).

A növekedésszabályozó anyag optimalizációs kísérlet eredményeképpen a Hógolyó esetében a legszebb, átültetésre alkalmas hajtáskezdemények a 0.9 mg/l BA, 0.6 mg/l IES és 0.26 mg/l ABS összetételű táptalajon fejlődtek (MDOP1). Közel azonos összetételt alkalmaztak növekedésszabályozó anyag kombinációs kísérletei során Niedz és munkatársai (1989). A Hale's Best esetében a növekedésszabályozó anyag optimalizációs kísérlet a 0.6 mg/l BA, 0.9 mg/l IES és 0.26 mg/l ABS összetételű táptalajon mutatta a leghatékonyabb hajtásregenerációt. Itt akár két-három hajtáskezdemény is megjelent egy sziklevéldarabon, azonban ebből végül legfeljebb egy-két teljes értékű hajtást tudtunk regenerálni sziklevéldarabonként (MDOP2).

A Hógolyó fajta esetében a szilárdító közegek összehasonlításakor a phytigel bizonyult hatékonyabbnak az agarral szemben, mert a regeneráció gyorsabb volt az előbbi használata esetén. A regenerált és felnevelt hajtások száma között nem volt szignifikáns különbség a sziklevéldarabonként, ellentétben Ficcadenti és Rotino (1995) eredményeivel, ahol agar tartalmú MS táptalajon szignifikánsan több hajtást tudtak indukálni sziklevelenként, ugyan olyan növekedésszabályozó anyag összetétel mellett. Yadav és munkatársai (1996) ezzel szemben szignifikánsan több növényt tudtak felnevelni a phytigel tartalmú táptalajon. A fent említett szerzők csak a felnevelhető regeneránsok számát vették a viszonyítás alapjául, de egyikük sem foglalkozott azzal hogy összehasonlítsa a növények felneveléséhez szükséges idő alapján az agar illetve phytigel szilárdító közegű táptalajokat. A phytigel kedvező hatását a nevelési időre elsőként állapítottuk meg Hógolyó sárgadinnye fajta esetében.

Kísérleteink során a Hógolyó fajtából összesen 6272 sziklevéldarabot transzformáltunk, ebből 206 gyökeres regeneráns növényt szelektáltunk, a transzformáció hatékonysága sziklevéldarabra nézve 0.032 volt. A Hale's Best fajtából összesen 12000 sziklevéldarabot transzformáltunk, ebből 230 gyökeres regeneráns növényt szelektáltunk, egy sziklevéldarabon átlagosan 0.02 gyökeres regeneránst tudtunk felnevelni. Ez az eredmény az irodalmi adatokhoz hasonló hatékonyságot mutat (1.9-3.2%-os transzformációs hatékonyság).

A transzformációs kísérletek eredményei alapján arra következtetünk, hogy a regenerációt erősen gátolja az *Agrobacterium*mal végzett transzformáció, valamint kis

mértékben az alkalmazott antibiotikumok is. A felnevelhető vélhetően transzformáns egyedek számának csökkenést minden egyes fejlődési fázisban megfigyeltük. Ez a csökkenés egyértelműen magának a transzformációs eljárásnak a hatása, ami egyrészt az *Agrobacterium* fertőzés okozta stressz, másrészt az alkalmazott antibiotikumok és egyéb szelekciós ágensek (glufozinát) hatása. A későbbi lépésekben a fázisok közötti csökkenést már egyértelműen a szelekciós rendszer hatékonyságának kell tulajdonítani, mivel azok a hajtáskezdemények, melyek nem transzformáns sejtekből indultak, nem tudtak tovább fejlődni. Ezzel a szelekció célja valósult meg, azaz hogy csak a transzformáns sejtekből, ill. hajtáskezdeményekből kapjunk növényeket. A szelekció hatékonyságát jól szemlélteti az **57. ábra**, ahol az azonos korú kontroll növény a szelekción átjutott vélhetően transzformáns növények mellé helyezve látható.

A munka során nem volt elsődleges célunk annak meghatározása, hogy a szelekción átesett, felnevelt növények, a transzformánsok milyen típusát képviselik. Vagyis nem vizsgáltuk, hogy hány kópiában épült be az idegen gén, vagy hogy mennyire volt aktív. Arra koncentráltunk, hogy maga az eljárás mennyire csökkenti az eredeti regenerációs folyamat hatékonyságát. Ehhez elegendőnek ítéltük azt, hogy csak erős szelekciós nyomás mellett felnevelt növényeket tekintsünk eredménynek. Csak azokat a növényeket tekintettük intakt növénynek, melyek habitusa normális, a kontroll növényekhez teljesen hasonló volt. A deformációkat, enációkat, szárvastagodásokat mutató egyedeket veszteségként számoltuk el. Ez az eljárás irodalmi adatokkal is indokolható. A szakirodalom szerint (Ezura et al. 1992, Ezura és Oosawa 1994, Adelberg et al., 1994, Curuk et al., 2003) a sziklevéldarabokból indított regeneráció során poliploid növények is keletkezhetnek, melyek esetleg robosztusabb megjelenéssel elűtnek a diploid egyedektől. Mi ezt a kérdést nem vizsgáltuk, de a későbbiekben, amennyiben ezekre a növényekre, mint lehetséges transzformánsokra szükség van, mind a ploid szint vizsgálatokat, mind az integráció genomi szintű bizonyítását el kell végezni. Az eredményeink szerint a transzformációs rendszer az irodalommal megegyező mértékben csökkentette a regeneráció hatékonyságát. Az egyes fajták és különböző szelekciós ágensek használata természetesen okoz különbségeket.

6.1.2. Sárgadinnye folyékony táptalajon

Több szerző is beszámolt sikeres regenerációról folyadékkultúrában szomatikus embriogenezis útján (Oridate és Oosawa 1986; Akasaka-Kennedy et al., 2004; Ezura és Akasaka-Kennedy 2004).

Sárgadinnye fajták válaszdó képességének tesztelése során legjobban a Muskotály és a Hógolyó fajta reagált a kezelésekre, ezért a kísérletek során ezeket a fajtákat választottuk ki a legrészletesebb vizsgálatok céljából. Jó válaszdó képessége miatt az Ezüstananász fajtát is terveztük bevonni a későbbi regenerációs kísérletekbe. A Hógolyó fajta már korábbi kísérletekben is jó válaszdónak bizonyult, az organogenezis indukciója során (Bárony et al 1999), azonban szomatikus embriogenezisen keresztül most sikerült először növényeket regenerálni belőle.

A növekedésszabályozó anyag optimalizációs kísérlet során arra a kérdésre kerestük a választ, hogy nagy mennyiségű 2,4-D hozzáadásával fokozható-e a szomatikus embriogenezis hatékonysága, ezen kívül a BA mennyiségének mekkora a szerepe az indukció során, illetve az inkubációs idő hossza hogyan befolyásolja a tenyészetek fejlődését. A 2,4-D és a BA hatását, miszerint szomatikus embriogenezis kiváltására alkalmas, korábban már bizonyították (Oridate és Oosawa, 1986; Trulson és Shahin, 1986; Branchard és Chateau, 1988b; Debeaujon és Branchard, 1988; Kintzios és Taravira, 1997). Kísérleteink során arra a következtetésre jutottunk, hogy a növényregeneráció szempontjából a 2 mg/l 2,4-D tartalmú táptalajok a legmegfelelőbbek. Ezeknél mind a 21, mind a 34 napos rázatás jó eredményt hozott, ez utóbbiból került ki a legtöbb növény. Emiatt a későbbiekben hosszabb rázatási időt is kipróbáltunk, a hatékonyság növelésére. A BA tartalom szerepe kevésbé egyértelmű. Magasabb BA koncentráció mellett a magdarabok színe élénkebb zöld volt, valamint a méretük is nagyobb volt. Ennek ellenére a továbbiakban mégsem alkalmaztunk 0,1 mg/l-nél magasabb BA koncentrációt, mivel a magas citokinin szint is felelős lehet a minták vitrifikálódásáért, ami mindenképp kiküszöbölendő folyamat (Jámborné Benczúr, 2005).

Eredményeink összhangban vannak Ezura és Akasaka-Kennedy (2004) eredményeivel. Az általuk alkalmazott 0,1 mg/l BA és 2 mg/l 2,4-D a Muskotály fajta esetében is a legjobbnak bizonyult, azonban az általuk alkalmazottnál (28 nap) hosszabb indukciós idő (34 nap) mellett. Ez felhívja a figyelmet a fajták eltérő indukciós igényére. Ezért a későbbiekben célszerű lehet azt is kipróbálni, hogy az indukciós időt 7 nap alá rövidítjük, nagyon magas 2,4-D koncentrációt alkalmazva (Fehér et al. 2002).

A magok életkorának jelentőségét a regeneráció során, valamint a magok életkorának és a szomatikus embriogenezis hatékonyságának kapcsolatát is vizsgáltuk. A frissen szedett érett sárgadinnye magvaiból indított tenyészetek jobban regeneráltak a kezelésre a tárolt magokból indítottakkal szemben. Ugyanakkor a friss magok esetében nagyobb volt a vitrifikációra való hajlam is. Tehát a regenerált növények számát emeli ugyan a friss magok alkalmazása, de a regenerált növények minőségét tekintve a száraz magok jobbnak

bizonyultak. A vitrifikáció vagy más néven hiperhidratáció *in vitro* kultúráknál gyakran fellépő rendellenesség. A hiperhidratáció kiküszöbölése a tenyésztés során igen fontos, mivel egy idő után a kultúra pusztulásához vezet. Ismert jelenség, hogy a növénykéek szöveti felépítésében változások lépnek fel. Kívülről a növény üvegesen áttetszőnek látszik, míg belül a levelek szabályos szöveti szerkezete helyett laza, szivacsos parenchima szövet található, a sejtközi járatok nagyok. A sejtek citoplazmájában nő a vakuólumok száma és mérete, ezek főleg vízzel teltek (Jámborné Benczúr, 2005).

A vitrifikáció jelenségét mi is megfigyeltük kísérleteink során. Okai közül az egyik legfontosabb a tenyészédények légterének magas relatív páratartalma, mely a folyadékkultúrák tenyésztés során fokozottan jelentkezhet. A vitrifikáció ellen védekezhünk a szilád táptalaj agar mennyiségének növelésével, mellyel csökkenthető a tenyészédényben levő relatív páratartalom. Gondot okozhat továbbá a táptalajhoz adott makro- és mikroelemek, valamint a cukor túl nagy mennyisége. Szintén vitrifikációt okozhat a rosszul megválasztott, illetve túl magas koncentrációjú citokinin adagolása is.

A friss magokból regenerált növények nagyobb arányú vitrifikációjának oka feltételezésünk szerint a friss magokban intenzívebben működő enzimrendszer, illetve a magok endogén növekedésszabályozó anyag szintjének hatásában keresendő. Ezeket a hatásokat a folyadékkultúrában való nevelés felerősíti. Valószínűleg a hiperhidratáció hatásának tudhatjuk be azt, hogy a 2%-os agarra helyezett mintákból több növényt sikerült felnevelni a friss magokból kiinduló tenyészetek esetében, mint 1% agar tartalom mellett. A 2% agart tartalmazó mintáknál gyakran fennállt a kiszáradás veszélye, az elégtelen vízellátás következtében az embriók egy részét elvesztettük. A hiperhidratáció kiküszöbölésére emiatt más módszert is figyelembe kell vennünk, nem csak a táptalaj keménységének fokozását.

A folyékony táptalaj összetevőinek szerepe az embriogenezis indukciójában: A kísérlet folyamán az MD12 táptalaj a kontroll szerepét tölti be, mivel ennek sem összetételét, sem pH értékét nem változtattuk az irodalomban talált táptalajhoz képest (Ezura és Akasaka-Kennedy, 2004)

A vizsgálat során felhasznált 6-féle táptalaj összevetése alapján megállapítható, hogy a különböző vitaminok hozzáadása nem váltotta be a hozzájuk fűzött reményeket. Az emelt szintű MS-vitamin tartalmú MS11 táptalaj és a normál vitamin tartalmú MS12 táptalaj összehasonlításakor sem a Muskotály, sem a Hógolyó fajta esetén nem volt jelentős eltérés a regeneráció hatékonyságában. A normál vitamin tartalmú MS14 és a B5 vitamint (pantoténsav) tartalmazó MS16 táptalajok között sem mutatható ki szignifikáns különbség a regenerált növények számát tekintve.

A kísérletet a szénforrás megválasztásának tekintetében értékelve megállapíthatjuk, hogy a szacharózt tartalmazó táptalajok (MD11, MD12, MD13) előnyösebbek a sárgadinnye embriogenezisének indukálása során a csak glükózt (MD14, MD15) tartalmazókkal szemben, illetve a vegyes szénforrást tartalmazó táptalajjal (MD16) szemben. Ez a megállapítás mind a Muskotály, mind a Hógolyó fajtákra érvényes. A három szénforrás közül leggyengébben a glükóz szerepelt, ezt bizonyítja, hogy az MD14 és MD15 táptalajokon regenerált a legkevesebb növény. Az MD16 táptalaj alkalmazásakor jobb eredményt értünk el, de még ez is alatta maradt a csak szacharózt tartalmazó táptalajok eredményeinek.

A szénhidrátok típusa és koncentrációja erősen befolyásolja a szomatikus embriogenezist sárgadinnye esetében (Oridate és Yasawa, 1990; Debeaujon és Branchard, 1992; Gray et al., 1993; Guis et al., 1997). Oridate és Yasawa (1990) különböző cukrok (szacharóz, glükóz, fruktóz, galaktóz) komplex kombinációját alkalmazva jutott a leghatékonyabb regenerációs módszerhez. Gray és munkatársai (1993) megállapították, hogy az indukciós és a növekedési táptalaj cukor koncentrációja egyértelműen meghatározza a szomatikus embriogenezis hatékonyságát. Végül megállapították, hogy a szacharóz ideális mennyisége az indukciós és növekedési táptalajban 3 %. Ha ennél magasabb vagy alacsonyabb koncentrációt alkalmaztak lecsökkent a regenerálható embriók száma.

Guis és munkatársai (1997) szomatikus embriogenezis útján szikleveleiből nyertek növényeket, szilárd táptalajon. Arról számoltak be, hogy a szacharóz, glükóz és maltóz szénforrások alkalmazása szignifikáns különbséget mutat a felnevelt növények számában. Az általunk elért eredményekkel szemben náluk a glükóz tartalmú táptalaj jobban szerepelt a szacharóz tartalmúnál, a maltóz viszont önmagában gátolta a szomatikus embriogenezist.

A kísérlet során továbbá megfigyeltük az indukciós idő hosszának szerepét is a különböző táptalajokon és fajtákon. Így következtetéseket vonhatunk le az embrió képződés dinamikájára vonatkozóan. Ennek érdekében nem egyszeri passzálást végeztünk, hanem a folyékony táptalajból folyamatosan, szabályos időközönként tettük szilárd táptalajra a kifejlődött embriókat. A Hógolyó és a Muskotály fajtáknál (elsősorban az MD13 mintákon) figyelhető meg az, hogy a viszonylag nagy növényhozamot eredményező 28 napos inkubációs idő után a 35 napos időszakban visszaesik az új növények száma, majd ezt követően a 43 napos rázatás után újra megemelkedik. Erre az lehet a magyarázat, hogy az embriók nem egy bizonyos pillanatban keletkeznek, hanem folyamatosan, több lépcsőben. A 35 napos rázatás esetében a visszaesést az okozhatja, hogy a 28. napon a jól fejlett embriók nagy része már szilárd táptalajra került, a második szélesztésre kevesebb maradt. Ha nem következne be további embrió képződés, akkor a szélesztések során egyre kevesebb embriót kellene

találunk. Azonban itt nem ez a helyzet, mivel a 43 napos rázatás után magasabb növényszámot tapasztaltunk. A 35. napi szélesztés során főként azokban a mintákban tapasztaltunk kiemelkedő növényszámot, ahol a 28. napon kevés embriót sikerült passzálni. Ebben az esetben valószínűleg arról van szó, hogy a tenyészet fejlődése valamilyen okból lemaradt, csak a második szélesztés idejére keletkeztek megfelelő nagyságú embriók. Az 50. nap után az esetek nagy részében nem tapasztaltunk magas növényszámot, ez után az indukciós idő után már nem érdemes fenntartani a tenyészeteket. Az Ezüstananász fajta a rázatórási idő szempontjából kissé eltérő módon viselkedik a másik két fajtához képest. Itt ugyanis a 35 nap körül tapasztaltuk a legmagasabb növényszámot, a 43 napos indukciós idő után már kevesebb, az 50 napos indukció esetében pedig elhanyagolható volt az újonnan regenerálódó növények száma. Erre a magyarázat talán a fajták eltérő tenészidejében keresendő: míg a Hógolyó és a Muskotály fajták középhosszú, hosszú tenészidejűek, addig az Ezüstananász rövid tenészidejű (Balázs, 1994).

A pH beállításakor, más növényeken folyadékkultúrában elért, illetve fermentoros sejttenyésztési eredményekre alapozva, az volt a hipotézisünk, hogy a folyékony táptalaj alacsony pH értékre való állításával optimálisabb környezetet tudunk teremteni a sejt szaporodáshoz és az embrió indukcióhoz. Ezt követően pedig szilárd táptalajon, annak magasabb pH értéke elősegíti az embrióképződését és az embriók intakt növényé differenciálódását. Az MD13 táptalaj pH értékét már a főzés során 4.6-ra állítottuk be, szemben az MD11 5.4 pH értékével, ami előnyös volt a magdarabok számára, mert a magok azonnal a számukra megfelelő környezetbe kerültek. Az eredmények összhangban vannak más növényeken elért eredményekkel (Martin és Rose 1975; Skirvin et al. 1986; Kovács et al. 1995) és arra mutatnak, hogy az alacsony pH (pH 4.5-4.6) a sárgadinnye esetében is a sejt szaporodásnak kedvez, de gátolja a differenciálódást, míg a magasabb pH (pH 4.8-5.2) segíti az embriófejlődést. Mivel a tenyészetek pH-ja kezdetben automatikusan pH 4.5-4.6-ra áll be, ezért célszerű a tenyésztést alacsony pH értéken indítani.

Ha a fajtákat a regenerált növény szám tekintetében hasonlítjuk össze, akkor kitűnik, hogy a Muskotály fajta áll az első helyen (összesen a kísérlet során 1222 db növényt sikerült regenerálni belőle). Összességében a Hógolyó és az Ezüstananász fajták is alkalmasnak bizonyultak szomatikus embriogenezis kiváltására, tehát mindhárom fajtaval érdemes foglalkozni a továbbiakban. A táptalajok közül egyértelműen az MD13 bizonyult legjobbnak, melyen már érdemes lehet elkezdeni transzformációs kísérleteket, akár mindegyik fajta esetében.

6.1.3. Tökfélék

A regenerációs kísérletek során kapott eredményeink általánosságban megegyeznek a szakirodalomból ismert eredményekkel, amennyiben a sziklevelek jó kiindulási anyagok (Jelaska, 1972; Katavic et al., 1991; Chee, 1992; Gonsalves et al., 1995; Abrie és van Staden, 2001; Lee et al., 2003; Urbanek et al. 2004; Zang et al., 2008) a kabakosok esetében a regenerációhoz és a félbevágott sziklevel hipokotilhoz közeli része a legjobb válaszadó (Lee et al., 2003).

A növekedésszabályozó anyagok vonatkozásában kísérleteinkben a 2,4-D több kipróbált koncentrációja sem volt hatásos, ellentétben Gonsalves és munkatársai (1995) eredményeivel. A növekedésszabályozó anyag mentes táptalajon ugyan kaptunk indukciót, de csak a sziklevéldarabok néhány százalékán ellentétben Rakoczy-Trojanowska és Malepszky (1989) közlésével. Ők azonban éretlen embriók sziklevelét használták, mi viszont csíranövények sziklevelét. Ez alátámasztja azt a megfigyelésünket, hogy a sziklevelek kora jelentősen befolyásolja a válaszadó képességet. Kísérleteink során 7-10 napos szikleveleket használtunk míg Lee és munkatársai 4 napos csíranövények szikleveleit alkalmazták.

A benziladenint önmagában vagy indolecetsavval kiegészítve is hatásosnak találtuk regeneráció szempontjából. A benziladenint önmagában 1 mg/l koncentrációban más szerzők is sikeresen alkalmazták több fajta esetében is (Ananthakrishnan et al., 2003; Lee et al., 2003; Kathiravan et al., 2006; Ananthakrishnan et al., 2007; Amutha et al., 2009b). Zang és munkatársai (2008) azonban nem tudtak szignifikáns különbséget kimutatni a 0,5, 1, illetve 2 mg/l BA tartalmú regenerációs táptalajon regenerált hajtások számában sziklevéldaraboként. Kísérleteink során a sütőtök esetében a legjobb hatást BA és IAA kombinációjával érték el. Urbanek és munkatársai (2004) olajtök esetében citokinint és auxint együttesen alkalmaztak hét napos szikleveleket felhasználva, azonban kísérleteik során NAA-t alkalmaztak és embriogenezis útján jutottak regeneráns növényekhez. Ananthakrishnan és munkatársai (2003) hozzánk hasonlóan organogenezis útján regeneráltak növényeket. Kathiravan és munkatársai (2006) 15 különböző tök fajtát vizsgálva 1.2 - 3.9 hajtás/szikleléldarab közötti eredményt értek el.

Általánosságban ismert, hogy a válaszadó képesség erősen genotípus függő, így eredményeink újnak és korábbi kísérleteket megalapozónak tekinthetők a vizsgált fajták vonatkozásában. A létrejött hajtásokon a gyökeresedés nehezen ment végbe kivéve a cukkínit, ahol viszont gyakran gyökereztető táptalaj nélkül járulékos hajtásképződés ment végbe. A gyökeresedés után a növények inkubációja már nem jelentett problémát, ezért különösen fontos, hogy egy hatásosabb gyökereztetési módot találjunk, például a növekedésszabályozó

anyag koncentráció megváltoztatásával vagy más növekedésszabályozó anyagok alkalmazásával.

A transzformáció esetében problémásnak találtuk az optimális kokultivációs idő megtalálását mivel a rövid együtt tenyésztés túlságosan lecsökkenti a transzformációs gyakoriságot, hosszabb kokultivációs idő viszont nagyon megnehezíti az *Agrobacterium* elölését. Az *Agrobacterium* felszaporodásának megakadályozása azért is fontos, mert a nagyobb mértékben fertőzött növények szállítószöveit a baktérium eltömi és ezzel megakadályozza a növények fejlődését. A szállítószövetek eltömődése miatt a levelek elhalnak és a növények pusztulni kezdenek.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A kutatás célja nyolc magyar sárgadinnyefajta és három tökféle *in vitro* regenerációjának indukálása, és ezzel egy biotechnológiai felhasználásra alkalmas *in vitro* regenerációs rendszer felállítása volt, melyhez a legmeghatározóbb paramétereket részletesen elemeztük.

A sárgadinnye esetében elsőként sikerült organogenezis útján a Javított Zentai, Muskotály, Tétényi csereshéjú és a Magyar kincs fajták esetében növényt regenerálnunk *in vitro* körülmények között sziklevelelből kiindulva, a Hógolyó és a Hale's Best fajták esetében pedig hipokotilból és dekapitált hipokotilból kiindulva.

A regeneráció leglényegesebb paraméterei közül szilárd táptalajon vizsgáltuk a különböző növényi részek regenerációs képességét, a 6-féle explant típus közül a legtöbb regeneránst a sziklevelekből nyertük. A Hógolyó sárgadinnye fajta esetében összesen 35-féle (különböző növekedés szabályozó anyagok kombinációját tartalmazó) táptalajt vizsgálva átültetésre alkalmas hajtások legnagyobb számban a 0.9 mg/l benziladenin és 0.6 mg/l indolecetsav összetételű táptalajon fejlődtek (MDOP1). A Hale's Best sárgadinnye fajta esetében pedig ugyan ezen táptalajok közül a 0.6 mg/l benziladenin és 0.9 mg/l indolecetsav összetételű táptalajon (MDOP2) keletkezett a legtöbb hajtás.

Vizsgáltuk továbbá a szilárdító közeg típusának hatását a regeneráció lefutása szempontjából, az összehasonlításból kitűnt, hogy a phytigel tartalmú táptalajok hatékonyabbak az agar tartalmúval szemben. A Hógolyó sárgadinnye fajta esetében a regeneráció ideje lecsökkent, átlagosan 12 nappal rövidebb idő alatt érték el a növények a gyökeres fázist.

A magyar sárgadinnye fajták válaszadó képességét tesztelve folyadékkultúrában, elsőként sikerült szomatikus embriogenezis útján növényeket regenerálni a Muskotály, a Hógolyó és az Ezüstananász fajták magjából. A Muskotály fajtával végzett növekedésszabályozó anyag optimalizációs kísérlet segítségével kiválasztottuk a megfelelő növekedésszabályozó anyag-koncentrációt folyékony táptalajon (0.1 mg/l BA és 2 mg/l 2,4 - D). A különböző szénforrások hatását vizsgálva pedig megállapítottuk, hogy a szacharózt tartalmazó táptalajok előnyösebbek a sárgadinnye embriogenezisének indukálása során (Muskotály és Hógolyó fajták).

Elsőként mutattuk meg a sárgadinnye esetében, hogy az alacsonyabb pH (4.6) kedvezően befolyásolja a szomatikus embriogenezis indukcióját, a magasabb pH (5.4) pedig a növényé differenciálódást (Muskotály, Hógolyó és Ezüstananász fajták). A Muskotály

fajtánál a magok életkorának hatását vizsgálva a szomatikus embriogenezisre megállapítottuk, hogy a fiatal magvakból indított tenyészetekből több növény nyerhető.

A továbbiakban pedig az általunk szilárd táptalajon kialakított organogenezisen alapuló módszernek a hatékonyságát teszteltük transzformációs rendszerben. Korábbi megfigyeléseinkkel összhangban a Phytigel szilárdító közegként a Hógolyó sárgadinnye fajtán végzett transzformációs kísérletek esetében is meggyorsította a növények felnevelését.

A transzformációs kísérletek eredményeképpen szelekciós táptalajon sikeresen felneveltünk növényeket, melyekkel azonos körülmények között lévő kontroll növények bizonyítottan elpusztultak. A feltehetően transzformáns növényeket sikeresen meggyökerezettük szelekciós táptalajon (Hógolyó és a Hale's Best fajták). A kiültetett növények az üvegházban virágot hoztak.

A tökfélék esetében elsőként regeneráltunk növényt sikeresen a Nagydobosi sütőtök és az Óvári fehér patisszon fajtákból *in vitro* körülmények között szikleveleiből kiindulva. A transzformációs kísérletek során sikeresen neveltünk fel szelekciós táptalajon Nagydobosi sütőtök növényeket. A valószínűleg transzformáns egyedeket sikeresen meggyökerezettük szelekciós táptalajon, majd a kiültetett növényeket virágzásig neveltük.

Végeredményben hatékony regenerációs rendszereket állítottunk fel szilárd és folyékony táptalajokat alkalmazva, melyek segítségével növényeket kaptunk a szilárd táptalajokon organogenezis útján, valamint folyadékkultúrában embriogenezis útján.

A regenerációs kísérleteink eredményeinek alapján megállapíthatjuk, hogy a vizsgált fajtákra szilárd táptalajon kialakított regenerációs protokollok elfogadható hatékonyságúak és ezeket transzformációs rendszerben alkalmazva megfelelő számú növény szelektálható.

8. SUMMARY

The purpose of this study was to screen the *in vitro* regeneration ability of nine melon varieties and three other cucurbits. The development of genetic transformation for melon and squash offers the potential of introducing valuable traits into this crop, e.g. disease resistance, high sugar content and high protein content to improve its productivity and quality beyond the limits of conventional breeding. Comparative experiments were conducted to determine the organogenic and embryogenic responsiveness of melon, zucchini, pumpkin and pattypan squash varieties, for further transformation experiments.

This is the first report on *in vitro* regeneration via organogenesis from cotyledon explants of four melon varieties: Javított Zentai, Muskotály, Tétényi csereshéjú, Magyar kincs; and from hypocotyl and decapitated hypocotyl explants of two other melon varieties: Hógolyó and Hale's Best.

In vitro morphogenetic responses are influenced by different factors. The most important factors are the composition of medium, the explant type, the cultivar and the plant growth regulators applied. Among these main factors, the explant source was studied to find the most appropriate one. Although most of the six explant types were suitable for regeneration, the highest number of shoots was counted on cotyledon explants. From 35 tested solid media (each contains different combination of plant growth regulators), the highest regeneration rates were observed on medium containing 0.9 mg/l BA, 0.6 mg/l IAA with 0.26 mg/l ABS in case of Hógolyó (MDOP1). The variety Hale's Best showed similar results on the media supplemented 0.6 mg/l BA, 0.9 mg/l IAA with 0.26 mg/l ABS (MDOP2). Comparing the gelling agent, we observed shorter regeneration period on the media containing phytagel contradict to media supplemented with agar. On the average, regenerated shoots became plants with fully developed roots 12 days earlier.

This is the first report to regenerate three melon varieties (Muskotály, Hógolyó and Ezüstananász) in liquid culture inducing somatic embryogenesis from matured seeds. In case of variety Muskotály the most efficient media to induce somatic embryos were supplemented with 0.1 mg/l BA and 2 mg/l 2,4-D. Comparing the effect of carbon sources, it was observed that somatic embryos occurred more frequently on media supplemented with saccharose (Muskotály and Hógolyó). In liquid culture, we observed that, lower pH (pH=4.6) increased the frequency of somatic embryogenesis, and higher pH (pH=5.4) promoted the differentiation of plantlets (varieties Muskotály, Hógolyó and Ezüstananász). Examining the influence of

seed-age on somatic embryogenesis in case of variety Muskotály, it was found that cultures started from just-matured seeds gave higher number of embryos.

Henceforward, our regeneration systems via organogenesis were applied in transformation experiments. According to our results, phytigel as gelling agent also promote shorter regenerating period in transformation system in case of Hógolyó.

On selection media, shoots from explants of Hógolyó and Hale's Best were successfully regenerated (compare to the control plantlets, where rapid necrosis were find). These shoots were rooted on selection media and after acclimatization, the well-rooted plans were cultured in greenhouse, where bloomed.

In case of the other three cucurbits, this is the first report on *in vitro* regeneration from cotyledon explants of pumpkin 'Nagydobosi' and pattypan squash 'Óvári fehér'. In transformation experiments, plants were regenerated on selection media, these plants were rooted and after acclimatization, were grown in greenhouse.

Eventually effective regeneration systems were established via organogenesis on solid media, and via somatic embryogenesis in liquid culture. According to these results, we can stated that these protocols are usable in transformation systems for the examined genotypes.

9. MELLÉKLETEK

9.1. Irodalomjegyzék

Abrie AL., van Staden J. (2001) Development of regeneration protocols for selected cucurbit cultivars *Plant Growth Regulation* 35: 263-267. p.

Adelberg J., Rhodes B., Skorupska H., Bridges W., (1994) Explant origin affects the frequency of tetraploid plants from tissue cultures of melon. *HortScience* 29(6): 689-692. p.

Akasaka-Kennedy Y., Tomita K., Ezura H. (2004) Efficient plant regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation via somatic embryogenesis in melon (*Cucumis melo* L.) *Plant Science* 166: 763-769. p.

Amutha S., Kathiravan K., Singer S., Jashi L., Shomer I., Steinitz B., Gaba V (2009a) Adventitious shoot formation in decapitated dicotyledonous seedlings starts with regeneration of abnormal leaves from cells not located in a shoot apical meristem *In Vitro Cell.Dev.Biol.—Plant* 45: 758-768. p.

Amutha S., Muruganantham M., Ananthakrishnan G., Yablonsky S., Singer, S., Gaba V. (2009b) Improved shoot regeneration due to prolonged seed storage. *Sci. Hort.* 119: 2 117-119. p.

Ananthakrishnan G., Xia X., Elman C., Singer S., Paris H., Gal-On A., Gaba V. (2003) Shoot production in squash (*Cucurbita pepo*) by *in vitro* organogenesis. *Plant Cell Rep* 21: 739-746. p.

Ananthakrishnan G., Xia X., Amutha S., Singer S., Muruganantham M., Yablonsky S., Fischer E., Gaba V. (2007) Ultrasonic treatment stimulates multiple shoot regeneration and explant enlargement in recalcitrant squash cotyledon explants *in vitro Plant Cell Rep* 26(3): 267-276. p.

Arche-Ochoa JP.; Dainello F.; Pike LM; Drews D. (1995) Field performance comparison of two transgenic summer squash hybrids to their parental hybrid line. *HortScience*, 30 (3) 492-493. p.

Atares A., Garcia-Sogo B., Pineda B., Ellul P., Moreno V. (2004) Transformation of melon via PEG-induced direct DNA uptake into protoplast In: A. Lebeda and H.S. Paris (Eds.) Progress in Cucurbit Genetics and Breeding Research. *Proceedings of Cucurbitaceae 2004 8th EUCARPIA Meeting on Cucurbit Genetics and Breeding*. 465-469. p.

Ayub R, Guis M, Amor MB, Gillot L, Roustan JP, Latché A, Bouzayen M, Pech JC (1996) Expression of ACC oxidase antisense gene inhibits the ripening of cantaloupe melon fruits. *Nat. Biotechnology*. 14: 862-866. p.

Balázs E., Dudits D. (szerk.) (1999) *Molekuláris növénybiológia szemelvények*. Akadémiai Kiadó, Budapest.

Balázs S. *Zöldségtermesztők kézikönyve*, 2. Kiadás. (1994) Mezőgazda Kiadó, Bp., 288-295. p.

Bársony Cs., Bisztray Gy., Bába E., Velich I. (1999) Shoot induction and plant regeneration from cotyledon segments of the muskmelon variety „Hógolyó”. *International Journal of Horticultural Science* 5 (1-2) 61-64. p.

Ben Amor M., Guis M., Latché A., Bouzayen M., Pech J.C., Roustan J.P. (1998) Expression of an antisense 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase gene stimulates shoot regeneration in *Cucumis melo*. *Plant Cell Reports*. 17: 586-589. p.

- Bisztray Gy., Bársony Cs., Bába E., Borókai R., Zarka V., Szabados A., Velich I. (2000) A görög és sárgadinnye *in vitro* regenerációja. VI. Növénynevelési Tudományos Napok (Összefoglalók) Magyar Tudományos Akadémia, Budapest 33. p.
- Bisztray Gy. (2001) *In vitro* rekombinációs DNS-technikák. In: Velich I. (szerk.) *Növény-genetika*. Bp. Mezőgazda Kiadó 365-406 p.
- Bisztray Gy. D., Kissné Bába E., Zarka V. (2005) Tök. In: Jámborné Benczúr E., Dobránszki J. (Szerk.) *Kertészeti növények mikroszaporítása*. Mezőgazda Kiadó. 149. p.
- Blackmon WJ., Reynolds BD., Postek CE (1981) Production of somatic embryos from callused cantaloupe hypocotyl explants. *HortScience* 16: 451. p.
- Bordas M., Montesinos C., Dabauza M., Salvador A., Roig L. A., Serrano R., Moreno V. (1997) Transfer of the yeast salt tolerance gene HAL1 to *Cucumis melo* L. cultivars and *in vitro* evaluation of salt tolerance. *Transgenic Research*. 6: 41-50. p.
- Borhidi A. (1995) *A zárvatermők fejlődésmeneti rendszertana*. Nemzeti Tankönyvkiadó, Budapest, 253. p.
- Branchard M., Chateau M., Mégnégneau B., Debeaujon I. (1988a) Somatic embryogenesis and plant regeneration from cotyledon callus culture of *Cucumis melo* In: INRA (Ed) *Cucurbitaceae 88, Proceedings of Eucarpia meeting on Cucurbit Genetics and Breeding*, Avignon-Montfavet, France, May 31-June 2, 1988. Paris, France 133-136. p.
- Branchard M., Chateau M. (1988b) Production of plants of muskmelon (*Cucumis melo* L.) by somatic embryogenesis. *Compt. Rend. Acad. Sci. Serie Iii-Sci. La Vie-Life Sci.* 307: 777– 780. p.
- Chee PP. (1991a) Somatic embryogenesis and plant regeneration of squash *Cucurbita pepo* L. cv. YC 60. *Plant Cells Reports*. 9 (11) 620-622. p.
- Chee PP. (1991b) Plant-regeneration from cotyledons of *Cucumis melo* Topmark. *HortScience*. 26: 908–910. p.
- Chee PP. (1992) Initiation and maturation of somatic embryos of squash (*Cucurbita pepo*). *HortScience* 27 (1) 59-60. p.
- Chee PP. (1997) Somatic embryogenesis and transformation of squash. *US Patent: 5,677,157* 1-10. p.
- Chu CC., Wang CC., Sun CS., Hus C., Yin KC., Chu CY. (1975) Establishment of an efficient medium for another culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Scientia Sinica*. 18: 659–668. p.
- Curuk S., Elman C., Schlarman E., Sagee O., Shomer I., Cetiner S., Gray DJ., Gaba V. (2002a) A novel pathway for rapid shoot regeneration from the proximal zone of the hypocotyl of melon (*Cucumis melo* L.). *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant* 38: 260-267. p.
- Curuk S., Cetiner S., Gaba V. (2002b) *In vitro* regeneration of some Turkish melon (*Cucumis melo* L.) cultivars. *Biotechnology and Biotechnological Equipment* 16 (2): 39-46. p.
- Curuk S., Ananthakrishnan G., Singer S, Xia XD, Elman C, Nestel D, Cetiner S, Gaba V (2003) Regeneration *in vitro* from the hypocotyl of *Cucumis* species produces almost exclusively diploid shoots, and does not require light. *HortScience* 38 (1): 105-109. p.

- Curuk S., Cetiner S., Elman C., Xia X., Wang Y., Yeheskel A., Zilbersztein L., Perl-Treves R., Watad A.A., Gaba V. (2005) Transformation of recalcitrant melon (*Cucumis melo* L.) cultivars is facilitated by wounding with carborundum *Eng Life Sci* 5 (2): 169-177. p.
- Debeaujon I., Branchard M. (1988) Somatic embryogenesis from protoplast derived callus of melon (*Cucumis melo* L.) In: INRA (Ed) *Cucurbitaceae* 88, *Proceedings of Eucarpia meeting on Cucurbit Genetics and Breeding*, Avignon-Montfavet, France, May 31-June 2, (1988.). Paris, France 139. p.
- Debeaujon I., Branchard M. (1992) Induction of somatic embryogenesis and caulogenesis from cotyledon and leaf protoplast-derived clones of melon (*Cucumis melo* L.) *Plant Cell Reports* 12: 37-40. p.
- Debeaujon I., Branchard M. (1993) Somatic embryogenesis in *Cucurbitaceae*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 34: 91-100. p.
- De Both M., Ben Tahar S., Noel M., Perret J. (1995) Transgenic plants belonging to the species *Cucumis melo* *US Patent* 5,422,259 1-18. p.
- Dirks R., van Buggenum M. (1989) *In vitro* plant-regeneration from leaf and cotyledon explants of *Cucumis melo* L. *Plant Cell Reports* 7: 626-627. p.
- Dong J. Z., Yang M. Z., Jia S.R., Chua N. H. (1991) Transformation of melon (*Cucumis melo* L.), and expression from the cauliflower mosaic virus 35S promoter in transgenic melon plants. *BioTechnology*. 9: 858-863. p.
- Duan X., Chen S. (1985) Variation of the characters in rice (*Oryza sativa*): induced by foreign DNA uptake. *China Agricult. Sci.* 3: 6-9. p.
- Duchefa. (1999) *Biochemicals plant cell and tissue culture catalogue*. Duchefa Biochemicals BV. 47. p.
- Dudits D., Heszy L. (2000) *Növényi biotechnológia és géntechnológia*. Agroinform Kiadó, Budapest 312. p.
- Ezura H., Amagai H., Yoshioka K., Oosawa K., (1992) Highly frequent appearance of tetraploidy in regenerated plants, a universal phenomenon, in tissue cultures of melon (*Cucumis melo* L.) *Plant Science* 85: 209-213 p.
- Ezura H., Oosawa K., (1994) Ploidy of somatic embryos and the ability to regenerate plantlets in melon (*Cucumis melo* L.) *Plant Cell Reports* 14: 107-111. p.
- Ezura H., Akasaka-Kennedy Y. (2004) Somatic embryogenesis in model cultivar, PI 161375 (*Cucumis melo* subsp. *agrestis*), of melon. In: A. Lebeda and H.S. Paris (Eds.) *Progress in Cucurbit Genetics and Breeding Research*. Proceedings of *Cucurbitaceae* (2004) 8th EUCARPIA Meeting on Cucurbit Genetics and Breeding. 431-435. p.
- Fang G., Grumet R. (1990) *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation and regeneration of muskmelon plants. *Plant Cell Reports*. 9: 160-164. p.
- Fang G., Grumet R. (1993) Genetic Engineering of Potyvirus Resistance Using Constructs Derived from the Zucchini Yellow Mosaic Virus Protein Gene. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 3: 358-367. p.

FAOSTAT (2009) Food and Agriculture Organization of the United Nations (for a world without hunger) <http://www.fao.org/corp/statistics/en/> FAOSTAT Agriculture, Crops (Utolsó frissítés: 2009. június 23.)

Fári M., Csányi M., Mitykó J., Peredi A., Szász A., Csillag A. (1995) An alternative pathway of in vitro organogenesis in higher plants: Plant regeneration via decapitated hypocotyls in three solanaceous vegetable genera. *Horticultural Scienc–Kertészettudomány, Biotechnology* 27: 9-15. p.

Feher A., Pasternak T., Otvos K., Miskolczi P., Dudits D. (2002) Induction of embryogenic competence in somatic plant cells: A review. *Biologica* 57 (1): 5-12. p.

Ficcadenti N., Rotino G.L. (1995) Genotype and medium affect shoot regeneration of melon. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 40: 293-295. p.

Fodor Z., Jasper A. (2009) Dinnyefélék. *A zöldség és gyümölcs ágazat helyzete Magyarországon* Kiadja a Magyar Kertészeti Tanács, Bp. 7-26. p.

Folk Gy., Glits M. (1993) *Kertészeti növénykórtan*. Mezőgazda kiadó, Bp. 61. p.

Fromm M., Taylor L.P., Valbot V. (1985) Expression of genes transferred into monocot and bicot plant cells by electroporation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 82: 5824-5828. p.

Fuchs M.; Gonsalves D. (1995) Resistance of transgenic hybrid squash ZW-20 expressing the coat protein genes of Zucchini yellow mosaic virus and Watermelon mosaic virus 2 to mixed infections by both potyviruses. *Bio/Technology* 13 (13): 1466-1473. p.

Fuchs M.; Klas FE.; McFerson JR.; Gonsalves D. (1998) Transgenic melon and squash expressing coat protein genes of aphid-borne viruses do not assist the spread of an aphid non-transmissible strain of cucumber mosaic virus in the field. *Transgenic-Research*. 7 (6): 449-462. p.

Gaba V., Kless H., Antignus L. (1992) Transformation of melon by particle acceleration. *Suppl. Plant Physiol*. 99: 137–137. p.

Gaba V., Elman C., Watad A. A. (1996) Ancymidol Hastens in Vitro Bud Development in Melon. *HortScience* 31(7):1223-1224. p.

Gaba V., Schlarman E., Elman C., Sagee O., Watad AA., Gray DJ (1999) In vitro studies on the anatomy and morphology of bud regeneration in melon cotyledons *In Vitro Cell Dev Biol – Plant* 35: 1-7. p.

Gaba V., Zelcer A., Gal-On A., (2004) Cucurbit biotechnology – The importance of virus resistance *In vitro Cell. Dev. Biol. – Plant* 40: 346-358. p.

Galperin M., Patlis L., Ovadia A., Wolf D., Zelcer A., Kenigsbuch D., (2003a) A melon genotype with superior competence for regeneration and transformation. *Plant Breeding* 12: 66-69. p.

Galperin M, Zelcer A, Kenigsbuch D (2003b) High competence for adventitious regeneration in the BU-21/3 melon genotype is controlled by single dominant locus. *HortScience* 38 (6): 1167-1168. p.

Gémesné Juhász A. és Kirilla Z. (2005) Uborka In: Jámborné Benczúr E., Dobránszki J. (Szerk.) *Kertészeti növények mikroszaporítása*. Mezőgazda Kiadó. 153-155. p.

Gonsalves D., Fuchs M., Klas F., Tennant P., Jones DD. (1994a) Field assessment of risks when using transgenic papayas, cucurbits and tomatoes expressing viral coat protein genes. *The biosafety results*

of field tests of genetically modified plants and microorganisms. Proceedings of the 3rd International Symposium, Monterey, California, USA, 13-16 November, 1994, 117-127. p.

Gonsalves C., Xue B., Yepes M., Fuchs M., Ling K.S., Namba S., Chee P., Slightom J.L., Gonsalves D. (1994b) Transferring cucumber mosaic virus-white leaf strain coat protein gene into *Cucumis melo* L. and evaluating transgenic plants for protection against infections. *Journal of Amer. Soc. Hort. Sci* 119: 345–355. p.

Gonsalves C., Xue B.D., Gonsalves D. (1995) Somatic embryogenesis and regeneration from cotyledon explants of six squash cultivars. *HortScience* 30 (6): 1295-1297. p.

Gray D.J., McColley D.W., Compton M.E. (1993) High frequency somatic embryogenesis from quiescent seed cotyledons of *Cucumis melo* cultivars. *Journal of Amer. Soc. Hort. Sci.* 118: 425-432. p.

Gray D.J., Hiebert E., Kelley K.T., Compton M.E., Gaba V.P. (1995) Comparison of methods to transform embryogenic cotyledons of melon. *HortScience* 30: 788–788. p.

Gray D. J. (1996) Somatic embryogenesis from seeds of melon. In: Trigiano R. N. and Gray D. J. (Eds.) *Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises*. CRC Press, New York. 161-166. p.

Guis M., Latché A., Pech J.C., Roustan J.P. (1997) An efficient method for production of diploid Cantaloupe Charentais Melon (*Cucumis melo* L. var. *cantalupensis*) by somatic embryogenesis. *Scientia Horticulturae* 69: 199-206. p.

Guis M., Ben Amor M., Latché A., Pech J.C., Roustan J.P. (2000) A reliable system for the transformation of cantaloupe charentais melon (*Cucumis melo* L. var. *cantalupensis*) leading to majority of diploid regenerants. *Scientie Horticulturea* 84: 91-99. p.

Gyurján I. (2004): Növényi embriogenezis és differenciáció. Eötvös Loránd Tudományegyetem Természettudományi Kar, Budapest, 170. p.

Horváth L., Gyulai G., Szabó Z., Lágler R., Tóth Z., Heszky L. (2007) Morfológiai diverzitás a sárgadinnyében (*Cucumis melo*); egy középkori típus fajtarekonstrukciója *Agrártudományi közlemények* 27: 84-90. p.

Jámborné Benczúr E. (2005) A mikroszaporítás szakaszai és módjai In: Jámborné Benczúr E., Dobránszki J. (Szerk.) *Kertészeti növények mikroszaporítása*. Mezőgazda Kiadó. 60-75. p.

Jelaska S. (1972) Embryoid formation and regeneration from hypocotyles in *Cucurbita pepo*. *Planta* 103: 278-280. p.

Jelaska S. (1974) Embryogenesis and organogenesis in pumpkin explants *Physiologia Plantarum* 31: 257-261. p.

Jelaska S., Magnus V., Seretin M., Lacan G. (1985) Induction of embryogenic callus in *Cucurbita pepo* hypocotyl explants by indole-3-ethanol and its sugar. *Physiologia Plantarum* 64 (2): 237-242. p.

Jenes B. (1999) Közvetlen DNS bevitel növényekbe, egyszikűek transzformációja In: Balázs, E., Dudits, D. (szerk.) *Molekuláris növénybiológia szemelvények*. Akadémiai Kiadó, Budapest. 627-664 p.

Juretic B., Katavic V., Jelaska S. (1989) *In vitro clonal* multiplication of *Cucurbita pepo* by single-node culture. *Acta Botanica Croatica* 48: 27-34. p.

- Juretic B., Jelaska S. (1991) Plant development in long-term embryogenic callus lines of *Cucurbita pepo*. *Plant Cell Reports* 9 (11): 623-626. p.
- Kageyama K., Kazunori Y., Miyajima S. (1990) Somatic embryogenesis and plant regeneration from stem, leaf and shoot apex of melon (*Cucumis melo* L.) *Plant Tissue Culture Lett.* 7: 193-198. p.
- Kageyama K., Yabei K., and Miyajima S. (1991) Somatic embryogenesis in suspension culture of mature seed of *Cucumis melo* L. *Japan J Breed.* 41: 273-278. p.
- Kataavic V., Jelaska S., Bakran-Petricioli T., David, C. (1991) Host-tissue differences in transformation of pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) by *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 24 (1): 35-42. p.
- Kathal R., Bhatnagar S.P., Bhojwani S.S. (1986) Regeneration of shoots from hypocotyl callus of *Cucumis melo* cv. *Pusa Sharbati*. *Journal of Plant Physiology* 126: 59-62. p.
- Kathal R., Bhatnagar S.P., Bhojwani S.S. (1988) Regeneration of plants from leaf explant of *Cucumis melo* cv. *Pusa Sharbati*. *Plant Cell Reports* 7: 449-451. p.
- Kathal R., Bhatnagar S.P., Bhojwani S.S. (1994) Plant regeneration from the callus derived from root explants of *Cucumis melo* L. cv. *Pusa Sharbati*. *Plant Science* 96: 137-142. p.
- Kathiravan K., Vengedesan G, Singer S, Steinitz B, Paris HS, Gaba V (2006) Adventitious regeneration in vitro occurs a wide spectrum of squash (*Cucurbita pepo*) genotypes. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 85: 285-295. p.
- Kapás S. (1986) *Zöldségfajtáink* Bp. Mezőgazdasági Kiadó.
- Kintzios S.E., Taravira N. (1997) Effect of genotype and light intensity of somatic embryogenesis and plant regeneration in melon (*Cucumis melo* L.). *Plant Breeding* 116: 359-362. p.
- Kintzios S., Sereti E., Bluchos P., Drossopoulos JB., Kitsaki CK., Liopa-Tsakalidis A. (2002) Growth regulator pretreatment improves somatic embryogenesis from leaves of squash (*Cucurbita pepo* L.) and melon (*Cucumis melon* L.). *Plant Cell Reports* 21 (1) 1-8. p.
- Kintzios S., Stavropoulou E., Skamneli S. (2004) Accumulation of selected macronutrients and carbohydrates in melon tissue cultures: association with pathways of in vitro dedifferentiation and differentiation (organogenesis, somatic embryogenesis) *Plant Science* 167 (3): 655-664. p.
- Kovacs G., Laszlo M., Rajkai G., Barnabas B. (1995) Monitoring of haploid maize cell suspension culture conditions in bioreactors. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 43 (2): 123-126. p.
- Kwack SN., Fujieda K. (1988) Somatic embryogenesis in cultured unfertilized ovules of *Cucurbita moschata*. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 57 (1): 34-42. p.
- Lee YK., Chung WI., Ezura H. (2003) Efficient plant regeneration via organogenesis in winter squash (*Cucurbita maxima* Duch.). *Plant Science* 164: 413-418. p.
- Ledaux L., Huart R. (1969) Fate of exogenous bacterial deoxyribonucleic acids in barley seedlings. *Journal of Molecular Biology* 43: 243-246. p.
- Li R., Sun Y., Zhang L., Li X. (1990) Plant regeneration from cotyledon protoplasts of Xinjiang muskmelon. *Plant Cell Reports* 9: 199-203. p.

- Liborio-Stipp LC; Januzzi Mendes BM; Stefano Piedade SMD; Martinelli Rodriguez AP (2001) *In vitro* morphogenesis of *Cucumis melo* var. *inodorus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 65 (1): 81-89. p.
- Martin S., Rose D. (1975) Growth of plant cell (*Ipomea*) suspension cultures at controlled pH levels. *Can. J. Bot.* 54: 1264-1270. p.
- Metwally E.I., Moustafa S.A., El Sawy B.I., Haroun S.A., Shalaby T.A. (1998a) Production of haploid plants from *in vitro* culture of unpollinated ovules of *Cucurbita pepo*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 52 (3): 117-121. p.
- Metwally E.I., Moustafa S.A., El Sawy B.I., Shalaby T.A. (1998b) Haploid plantlets derived by anther culture of *Cucurbita pepo*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 52 (3): 171-176. p.
- Mihalka V., Fari M., Szasz A., Balazs E., Nagy I. (2000) Optimised protocols for efficient plant regeneration and gene transfer in pepper (*Capsicum annuum* L.) *J. Plant Biotechnology* 2(3): 143-149. p.
- Miller H. (1987) Practical aspects of preparing phage and plasmid DNA: growth, maintenance, and storage of bacteria and bacteriophage. *Meths. Enzymol.* 152, 145-170. p.
- Miranda A., Jansen G., Hodges L., Peralta E. G., Ream W. (1992) *Agrobacterium tumefaciens* transfers extremely long T-DNAs by a unidirectional mechanism. *J Bacteriol.* 174: 2288-2297. p.
- Molina RV., Nuez F. (1995a) Characterization and classification of different genotypes in a population of *Cucumis melo* based on their ability to regenerate shoots from leaf explants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 43: 249-257. p.
- Molina RV., Nuez F. (1995b) Correlated response of *in vitro* regeneration capacity from different source of explants in *Cucumis melo*. *Plant Cell Reports* 15: 129-132. p.
- Moreno V., Garcia-Sogo M., Granell I., Garcia-Sogo B., Roig L. A. (1985) Plant regeneration from calli of melon. (*Cucumis melo* L. cv. 'Amarillo Oro'). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 5: 139-146. p.
- Murashige T., Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 155: 473-497. p.
- Nagesha N., Ramanjini Gowda P.H., Madhusudana S.N., Lokesh J., Vinay N.J., Michelle, K., Devaiah B.N., Madhuvanthi R., Vanikulkarni; Saraswathi S., Dinesh A.N., Gowda T.K.S., Mehamooda K. (2007) Genetic transformation of cantaloupe melon (*Cucumis melo* L.) with the rabies virus glycoprotein gene (PRGSpRgp) and immunisation studies in mice *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 82(3): 383-386. p.
- Nagy Gy. (1989) *Különleges tökfélék termesztése* Mezőgazdasági Kiadó, Budapest
- Nagy J. (1997) *Dinnye, uborka, tök* Mezőgazdasági Szaktudás Kiadó, Budapest
- Nagy J. (2005) *A sárga- és görögdinnye* Szaktudás Kiadó Ház Rt., Budapest. 390 p.
- Niedz R.P., Smith S.S., Dunbar K.B., Stephens C.T., Murakishi H.H. (1989) Factors influencing shoot regeneration from cotyledonary explants of *Cucumis melo*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 18: 313-319. p.

- Nitsch J.P. (1951.) Growth and development in vitro of excised ovaries. *Am. J. Bot.* 38: 566-576. p.
- Nora FR., Peters JA., Schuch MW.; Lucchetta L., Marini L., Silva JA., Rombaldi CV. (2001) Melon regeneration and transformation using an apple ACC oxidase antisense gene. *Rev. Bras. de Agrociencia*, 7, 3: 201-204. p.
- Nunez-Palenius HG., Cantliffe Daniel J., Huber Don J., Ciardi Joseph, Klee Harry J. (2006) Transformation of a muskmelon 'Galia' hybrid parental line (*Cucumis melo* L. var. *reticulatus* Ser.) with an antisense ACC oxidase gene. *Plant cell reports* 25 (3) 198-205. p.
- Nunez-Palenius HG, Donald J. Huber, Harry J. Klee and Daniel J. Cantliffe (2007) Fruit ripening characteristics in a transgenic 'Galia' male parental muskmelon (*Cucumis melo* L. var. *reticulatus* Ser.) line. *Postharvest Biology and Technology* 44 (2) 95-100. p.
- Nunez-Palenius HG, Gomez-Lim M., Ochoa-Alejo N., Grumet R., Lester G., Cantliffe DJ. (2008) Melon fruits: Genetic diversity, physiology, and biotechnology features. *Critical Reviews in Biotechnology* 28: 13-55. p.
- Oridate, T., and Oosawa, K. 1986. Somatic embryogenesis and plant regeneration from suspension callus culture in melon (*Cucumis melo* L.). *Jpn. J. Breeding* 36: 424-428. p.
- Oridate, T., and Yasawa, H. 1990. Effect of carbohydrates on somatic embryogenesis and embryo development in muskmelon. *VIIth IAPTC Congress*, 24-29 June 1990, Amsterdam, Holland, 262. p.
- Oridate T., Atsumi H., Ito S., Araki H., (1992) Genetic difference in somatic embryogenesis from seeds in melon (*Cucumis melo* L.) *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 29: 27-30. p.
- Pang SZ., Jan FJ., Tricoli DM., Russell PF., Carney KJ., Hu JS., Fuchs M., Quemada, HD. Gonsalves D. (2000) Resistance to squash mosaic comovirus in transgenic squash plants expressing its coat protein genes. *Molecular Breeding* 6, 87-93. p.
- Punja ZK., Abbas N., Sarmiento GG., Tang FA. (1990) Regeneration of *Cucumis sativus* var. *Sativus* and *Cucumis sativus* var. *Hardwickii*, *Cucumis melo*, and *Cucumis metuliferus* from explants through somatic embryogenesis and organogenesis—influence of explant source, growth-regulator regime and genotype. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 21: 93-102. p.
- Qiagen G. (2000) *DNeasy Plant Mini Kit and DNeasy Plant Maxi Kit Handbook* 15-17. p.
- Qiu Z., Bársony Cs., Bisztray Gy., Velich I., (1999) The effects of some parameters on *Agrobacterium*-mediated transformation in muskmelon. *International Journal of Horticultural Science* 5 (3-4): 46-49. p.
- Quemada HD. (1994) The Asgrow Seed Company's experience with vegetable biotechnology In: Krattiger AF.; Rosemarin A. (Eds.) *Biosafety for sustainable agriculture: Sharing biotechnology regulatory experiences of the Western Hemisphere*. ISAAA: Ithaca & SEI: Stockholm 167-173. p.
- Quemada HD. (1996) Food safety evaluation of a transgenic squash. *Food safety evaluation*. Proceedings of an OECD-sponsored workshop held on 12-15 September 1994, Oxford, UK. 71-79. p.
- Quemada HD. (1998) The use of coat protein technology to develop virus-resistant cucurbits. In: Ives CL. Bedford BM. (Eds.) *Agricultural biotechnology in international development*. CAB International, Wallingford, UK, 147-160. p.

- Rahman SM., Hossain M., Islam R., Joarder OI. (1993) Plant regeneration from internode explants of *Cucurbita maxima* Duch. × *Cucurbita moschata* Duch. *Current-Science* 65 (7): 562-564. p.
- Rakoczy-Trojanowska M., Malepszky S. (1989) A method for increased plant regeneration from immature F1 and BC1 embryos of *Cucurbita maxima* Dutch. × *C. Pepo* L. hybrids. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 18 (2): 191-194. p.
- Rhimi A., Ben Fadhel N., Boussaid M. (2006) Plant regeneration via somatic embryogenesis from *in vitro* tissue culture in two Tunisian *Cucumis melo* cultivars Maazoun and Beji. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 84: 239-243. p.
- Roustan JP., Latche A., Fallot J. (1992) Enhancement of shoot regeneration from cotyledons of *Cucumis melo* by AgNO₃, an inhibitor of ethylene action. *J. Plant Physiol.* 140: 485-488. p.
- Rowell B., Nesmith W., Snyder JC. (1999) Yields and disease resistance of fall-harvested transgenic and conventional summer squash in Kentucky. *HortTechnology*. 9 (2): 282-288. p.
- Sambrook J., Fritsch EF., Maniatis T. (1982) Gel electrophoresis of DNA. In: *Molecular cloning: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 6.1-6.62. p.
- Schroeder CA. (1968) Adventive embryogenesis in fruit pericarp tissue *in vitro*. *Bot. Gaz.* 129(4): 374-376. p.
- Serrano R., Culianz-Macia F. A., Moreno V. (1999) Genetic engineering of salt and drought tolerance with yeast regulatory genes. *Scientia Horticulturae* 78: 261-269. p.
- Shah P., Singh NK., Khare N., Rathore M., Anandhan S., Arif M., Singh RK., Das SC., Ahmed Z., Kumar N. (2008) *Agrobacterium* mediated genetic transformation of summer squash (*Cucurbita pepo* L. cv. Australian green) with *cbf-1* using a two vector system *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 95, 3: 363-371. p.
- Shiboleth YM., Arazi T., Wang Y., Gal-On A. (2001) A new approach for weed control in a cucurbit field employing an attenuated potyvirus-vector for herbicide resistance. *J. Biotech.* 92: 37-46. p.
- Silva JA., da Costa TS., Lucchetta L., Marini LJ., Zanuzo MR., Nora L., Nora FR., Twyman RM., Rombaldi CV. (2004) Characterization of ripening behavior in transgenic melons expressing an antisense 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) oxidase gene from apple. *Postharvest Biol. Tec.* 32: 263-268. p.
- Singh M., Misra AK., and Bhatnagar SP. (1996) *In vitro* production of plants from cotyledon explants of *Cucumis melo* L. and their successful transfer to field. *Phytomorphology* 46: 395-402. p.
- Skirvin RM., Chu MC., Mann ML., Young H., Sullivan J. and Fermanian T. (1986) Stability of tissue culture medium pH as a function of autoclaving, time, and cultured plant material. *Plant Cell Reports* 5: 292-294. p.
- Szabó Z., Gyulai, G. Humphreys M., Lágler R., Bittsánszky A., Horváth L., Holly L., Heszky L. (2005) Genetic variation of melon (*C. melo*) compared to an extinct landrace from the Middle Ages (Hungary). *Euphytica* 146, 87-94. p.
- Szalai I. (1994) *A növények élete* JATE Press. Szeged.
- Szamosi Cs. (2005) The importance of Hungarian melon (*Cucumis melo* L.) landraces, local types and old varieties (Review) *International Journal of Horticultural Science* 11: 83-87. p.

- Tabei Y., Kanno T., Nishio T. (1991) Regulation of organogenesis and somatic embryogenesis by auxin in melon, *Cucumis melo* L. *Plant Cell Reports* 10: 145-148. p.
- Taler D., Galperin M., Benjamin I., Cohen Y., Kenigsbuch D. (2004) Plant eR genes that encode photorespiratory enzymes confer resistance against disease. *Plant Cell* 16: 172–184. p.
- Tavazza R, Tavazza M, Ordas RJ, Ancora G, Benvenuto E (1988) Genetic transformation of potato (*Solanum tuberosum*); an efficient method to obtain transgenic plants. *Plant Science* 59: 175-181. p.
- Tóbiás I., Palkovics L. (2003) Characterization of Hungarian isolates of zucchini yellow mosaic virus (ZYMV, potyvirus) transmitted by seeds of *Cucurbita pepo* var. Styriaca. *Pest Manag. Sci.* 59: 493-499. p.
- Toppi-LS-di, Pecchioni, N., Durante M. (1997) *Cucurbita pepo* L. can be transformed by *Agrobacterium rhizogenes* *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 51 (2): 89-93. p.
- Tóth E. (2005) A gázok és a páratartalom, a nevelőedény megválasztása. In: Jámborné Benczúr E., Dobránszki J. (Szerk.) *Kertészeti növények mikroszaporítása*. Mezőgazda Kiadó. 57-59. p.
- Tricoli DM., Carney KJ., Russell PF., McMaster JR., Groff D., Hadden KC., Himmel PT., Hubbard JP., Boeshore ML., Quemada HD. (1995) Field evaluation of transgenic squash containing single or multiple virus coat protein gene constructs for resistance to cucumber mosaic virus, watermelon mosaic virus 2, and zucchini yellow mosaic virus. *Bio Technology*. 13 (13): 1458-1465. p.
- Trulson AJ., Shahin EA. (1986) *In vitro* plant regeneration in the genus *Cucumis*. *Plant Science* 47: 35-43. p.
- Urbanek A., Zechmann B., Müller M. (2004) Plant regeneration via somatic embryogenesis in Styrian pumpkin: cytological and biochemical investigations *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 79(3): 329-340. p.
- Vallés M. P., Lasa J. M. (1994) *Agrobacterium*-mediated transformation of commercial melon (*Cucumis melo* L., cv. Amarillo Oro). *Plant Cell Reports*. 13: 145-148. p.
- Vargha A., (2000) *Matematikai statisztika - Pszichológiai Nyelvészeti és Biológiai alkalmazásokkal* Bp. Pálya kiadó
- Wu HW., Yu TA., Raja JAJ., Wang HC., Yeh SD. (2009) Generation of transgenic oriental melon resistant to *Zucchini yellow mosaic virus* by an improved cotyledon-cutting method *Plant Cell Rep* 28: 1053–1064. p.
- Yadav R.C., Saleh M. T., Grumet R. (1996) High frequency shoot regeneration from leaf explants of muskmelon. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 45: 207-214. p.
- Yalcin-Mendi NY., M. Ipek, S. Serbest-Kobaner, S. Çürük, Y. Aka-Kacar, S. Çetiner, V.Gaba, R. Grumet, (2004) "*Agrobacterium*-mediated transformation of 'Kirkagac 637' a recalcitrant melon (*Cucumis melo* L.) Cultivar with ZYMV Coat Protein Encoding Gene". *Europ. J. Hort. Sci.* 69 (6): 258-262. p.
- Yoshioka K., Hanada K., Nakazaki Y., Minobe Y., Yakuwa T., Oosawa K. (1992) Succesful transfer of the cucumber mosaic virus coat protein gene to *Cucumis melo* L. *Jap. Breed.* 43: 629-634. p.
- Zaenen J., van Larebeke N., Tenchz H., Schell J. (1974) Supercoiled circular DNA in crown gall inducing *Agrobacterium* strains. *J. Mol. Biol.*, 86: 109-127. p.

Zhang Y., Zhou J., Wu T., Cao J. (2008) Shoot regeneration and relationship between organogenic capacity and endogenous hormonal contents in pumpkin. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 93 323–331. p.

Zarka V. és Szalai J. (2005) Görögdinnye In: Jámborné Benczúr E., Dobránszki J. (Szerk.) *Kertészeti növények mikroszaporítása* Mezőgazda Kiadó, Bp. 145-147. p.

9.2. Az értekezés témakörében megjelent publikációk

Folyóiratcikkek

IF-os folyóiratcikk

Kiss-Bába E., Pánczél S., Velich I., Bisztray G. D. (2010) Influence of genotype and explant source on the *in vitro* regeneration ability of different melon varieties. Acta Biologica Hungarica (in press)
IF: 0.619 (2008)

NEM IF-os folyóiratcikk

Kiss-Bába E., Pánczél S., Simonyi K., Bisztray Gy. D. (2010) Investigations on the regeneration ability of squash cultivars. Acta Agronomica Hungarica (in press)

Bársony Cs., Bisztray Gy., **Bába E.** and Velich I. (1999) Shoot induction and plant regeneration from cotyledon segments of the muskmelon variety „Hógolyó”. International Journal of Horticultural Science 5, (1-2): 61-64 p.

Bába E., Zarka V., Deák T., Pedryc A., Velich I., Bisztray Gy. D. (2002) Molecular diversity of Hungarian melon varieties revealed by RAPD markers. International Journal of Horticultural Science 8, (3-4): 11-13 p.

Könyvrészlet

Magyar nyelvű

Kissné Bába E. Bisztray Gy. D. (2005) Sárgadinnye, In: Jámborné Benczúr E., Dobránszki J. (szerk.): Kertészeti növények mikroszaporítása. Mezőgazda Kiadó. 147-149 p.

Bisztray Gy. D. **Kissné Bába E.** Zarka V. (2005) Tök, In: Jámborné Benczúr E., Dobránszki J. (szerk.): Kertészeti növények mikroszaporítása. Mezőgazda Kiadó. 149-153 p.

Kissimon J., **Kissné Bába E.** (2005) Fotoszintetikus sajátosságok változtatása a mikroszaporítás során, In: Jámborné Benczúr E., Dobránszki J. (szerk.): Kertészeti növények mikroszaporítása. Mezőgazda Kiadó. 87-95 p.

Konferencia kiadványok

Nemzetközi konferencia (full paper)

Bába E., Zarka V., Pedryc A., Velich I., Bisztray Gy. D. (2003) The Use of RAPD markers for distinction of Hungarian melon and watermelon cultivars. 4th International Conference of PhD students in Miskolc Agriculture section 175-180 p.

Kiss-Bába E., Pánczél S., Zarka V., Bisztray Gy. D., Velich I. (2004) Regeneration ability of some Hungarian melon varieties, In: A. Lebeda and H.S. Paris (Eds.) Progress in Cucurbit Genetics and Breeding Research. Proceedings of Cucurbitaceae 2004 8th EUCARPIA Meeting on Cucurbit Genetics and Breeding. (July 12-17, Olomouc, Czech Republic) 437-439 p

Deák T., Seregély Zs., Kaffka K.J., **Bába E.**, Zarka V., Bisztray Gy.D. (2004) Distinction of melon genotypes using NIR spectroscopy. In (Daevis and Garrido-Varo ed.): Near Infrared Spectroscopy: Proceedings of the 11th International Conference. NIR Publications, Charlton Mill, UK. 385-388. p

Kiss-Bába E., K. Simonyi, V. Zarka, I. Tóbiás, I. Velich, Gy. D. Bisztray (2006) Experiments on transformation and *in vitro* regeneration of squash varieties. 5th In Vitro Culture and Horticultural Breeding Symposium, (12-17. September 2004., Debrecen, Hungary) ISHS Acta Horticulturae 725 Vol. 2. 791-794 p.

Magyar nyelvű (abstract)

Bába E., Velich I., Bisztray Gy. (2000) A sárgadinnye *in vitro* regenerációja sziklevélből. Lippay János & Vas Károly Tudományos Ülésszak, Élettani és Genetikai Kutatások Kertészeti alkalmazása Szekció, (2000. november 6-7, Budapest). Összefoglalók 136-137 p.

Bisztray Gy., Bársony Cs., **Bába E.**, Borókai R., Zarka V., Szabados A., Velich I. (2000) A görög és sárgadinnye *in vitro* regenerációja. VI. Növény-nemesítési Tudományos napok (2000. március 8-9. Budapest) Összefoglalók 33 p

Bába E., Bisztray Gy., Velich I. (2001) A sárgadinnye *in vitro* regenerációja sziklevélből. VII. Növény-nemesítési Tudományos napok (2001. január 23-24. Budapest) Összefoglalók 70 p.

Bába E., Zarka V., Bisztray Gy. D., Velich I. Tóbiás I. (2003) Transzformációs kísérletek a vírusrezisztencia kialakítására sárgadinnyénél. IX. Növény-nemesítési Tudományos napok (2003. március 5-6. Budapest) Összefoglalók 75 p.

Kissné Bába E. Zarka V., Bisztray Gy. D., Velich I., Tóbiás I. Transzformációs kísérletek sárgadinnyén. (2003) „Lippay János - Ormos Imre - Vas Károly” Tudományos Ülésszak, Biotechnológiai, alkalmazott genetikai és növényélettani Szekció, (2003. november 6-7. Budapest). Összefoglalók: 100-101 p.

Simonyi K, **Kissné Bába E.**, Bisztray Gy., Velich I. (2004) Kabakosok *in vitro* regenerációja sziklevélből. X. Növény-nemesítési Tudományos Napok (2004. február 18-19. Budapest) Összefoglalók 148 p.

Kissné Bába E., Simonyi K. Pánczél S., Tóbiás I., Velich I., Bisztray Gy. D. (2005) Transzformációs kísérletek kabakosoknál. XI. Növény-nemesítési Tudományos Napok (2005. március 3-4. Budapest) Összefoglalók 101 p.

Bisztray Gy. D. **Kissné Bába E.**, Sz. Nagy L., Bodor P., Simonyi K. Deák T., Pánczél S., Bacsó R. Zarka V., Oláh R. Tóbiás I., Balog I., Velich I. (2005) Molekuláris növény-nemesítési módszerek alkalmazása kabakosoknál és szőlőnél. XI. Növény-nemesítési Tudományos Napok (2005. március 3-4. Budapest) Összefoglalók 19 p.

Kissné Bába E., Gyurcsáné Millei Á., Pánczél S., Velich I., Bisztray Gy. D. (2006) A regeneráció hatékonysága embriogenezis és organogenezis útján sárgadinnyénél. XII. Növény-nemesítési Tudományos Napok (2006. március 7-8. Budapest) Összefoglalók 136 p.

Pánczél S., **Kissné Bába E.**, Bisztray Gy. D. (2007) Magyar sárgadinnye fajták *in vitro* regenerációja szomatikus embriogenezis útján. XIII. Növény-nemesítési Tudományos Napok (2007. március 12. Budapest) Összefoglalók 115 p.

Pánczél S., **Kissné Bába E.**, Gell Gy., Balázs E. (2008) A hipokotil *in vitro* regenerációs képességének vizsgálata sárgadinnye és olajtök csíranövényeken. XIV. Növény-nemesítési Tudományos Napok (2008. március, Budapest) Összefoglalók 77 p.

9.3. Statisztikai számítások

9.3.1. Fertőtlenítési eljárások összehasonlítása

Statisztikai rutin: Független minták egyszempontos összehasonlítása

Elemzés sorszáma = 1

Beolvasott esetek száma. 18
Érvényes esetek száma. 18

Jelölés: +: $p < 0.10$ *: $p < 0.05$ **: $p < 0.01$

Függő változó: csirázás (2)

Csoportosító változó: fertőtlenítő anyag

Csoport Index	Név	Érvényes esetek	átlag	szórás	Minimum	Maximum
1.	Clorox 15	3	98.00	2.646	95	100
2.	Clorox 20	3	89.00	2.646	86	91
3.	Clorox 30	3	83.67	5.033	79	89
4.	EtOH+NaOCl 30	3	65.33	4.726	60	69
5.	H2O2 20	3	78.00	3.606	75	82
6.	H2O2 30	3	77.00	5.568	72	83

Elméleti szórások egyenlőségének tesztelése

- O'Brien-próba: $F(5; 12) = 0.457$
- Levene-próba: $F(5; 12) = 0.636$

Elméleti átlagok egyenlőségének tesztelése

Hagyományos eljárás, amely feltételezi a szóráshomogenitást:

- Varianciaanalízis: $F(5; 12) = 21.341^{**}$
Hatásvariancia = 375.8333, Hibavariancia = 17.6111
Korrelációs hányados (nemlineáris korrel. együtttható): $e = 0.948$

Robusztus eljárások, amelyeknél nem szükséges a szóráshomogenitás:

- Welch-próba: $W(5; 6) = 19.680^{**}$
- James-próba: $U = 145.895^{*}$
- Brown-Forsythe-próba: $BF(5; 9) = 21.341^{**}$

Az átlagok Tukey-Kramer-féle páronkénti összehasonlítása ($k = 6, f = 12$):

T12= 3.71+	T13= 5.92*	T14= 13.48**	T15= 8.25**	T16= 8.67**
T23= 2.20	T24= 9.77**	T25= 4.54+	T26= 4.95*	T34= 7.57**
T35= 2.34	T36= 2.75	T45= 5.23*	T46= 4.82*	T56= 0.41

9.3.2. Kilenc sárgadinnye fajta regenerációs képességének vizsgálata ötféle táptalajon

Statisztikai rutin: Független minták egyszempontos összehasonlítása

Elemzés sorszáma = 1

Beolvasott esetek száma. 31
Érvényes esetek száma. 15

Jelölés: +: $p < 0.10$ *: $p < 0.05$ **: $p < 0.01$

Függő változó: Javított Zentai (2)

Csoportosító változó: taptalaj

Csoport Index	Név	Érvényes esetek	átlag	szórás	Minimum	Maximum
1.	MD6	3	0.0000	0.0000	0	0
2.	MD7	3	6.667	1.528	5	8
3.	MD8	3	0.0000	0.0000	0	0
4.	MD9	3	9.333	2.082	7	11
5.	MD10	3	8.667	3.786	6	13

Elméleti szórások egyenlőségének tesztelése

- O'Brien-próba: $F(4; 10) = 1.146$
- Levene-próba: $F(4; 10) = 7.038^{**}$

Elméleti átlagok egyenlőségének tesztelése

- Hagyományos eljárás, amely feltételezi a szóráshomogenitást:
- Varianciaanalízis: $F(4; 10) = 15.175^{**}$
- Hatásvariancia = 63.7333, Hibavariancia = 4.2000
- Korrelációs hányados (nemlineáris korrel. együtttható): $e = 0.927$

Robusztus eljárások, amelyeknél nem szükséges a szóráshomogenitás:

- Welch-próba: $W(4; 5) = \text{Nem értelmezhető}$
- James-próba: $U = \text{Nem értelmezhető}$
- Brown-Forsythe-próba: $BF(4; 4) = 15.175^{*}$

Az átlagok Tukey-Kramer-féle páronkénti összehasonlítása ($k = 5, f = 10$):

T12= 5.63* T13= 0.00 T14= 7.89** T15= 7.32** T23= 5.63*
T24= 2.25 T25= 1.69 T34= 7.89** T35= 7.32** T45= 0.56

Függő változó: Muskotály (3)

Csoportosító változó: taptalaj

Függő változó: Topáz (4)

Csoportosító változó: taptalaj

Függő változó: Hógolyó (5)

Csoportosító változó: taptalaj

Csoport Index	Név	Érvényes esetek	átlag	szórás	Minimum	Maximum
1.	MD6	3	38.67	3.786	36	43
2.	MD7	3	18.33	3.055	15	21
3.	MD8	3	0.0000	0.0000	0	0
4.	MD9	3	21.33	4.509	17	26
5.	MD10	3	26.00	4.583	22	31

Elméleti szórások egyenlőségének tesztelése

- O'Brien-próba: $F(4; 10) = 0.574$

- Levene-próba: $F(4; 10) = 1.961$

Elméleti átlagok egyenlőségének tesztelése

Hagyományos eljárás, amely feltételezi a szóráshomogenitást:

- Varianciaanalízis: $F(4; 10) = 45.303^{**}$

Hatásvariancia = 588.9333, Hibavariancia = 13.0000

Korrelációs hányados (nemlineáris korrel. együtttható): $e = 0.973$

Robusztus eljárások, amelyeknél nem szükséges a szóráshomogenitás:

- Welch-próba: $W(4; 4) = \text{Nem értelmezhető}$

- James-próba: $U = \text{Nem értelmezhető}$

- Brown-Forsythe-próba: $BF(4; 7) = 45.303^{**}$

Az átlagok Tukey-Kramer-féle páronkénti összehasonlítása ($k = 5, f = 10$):

T12= 9.77** T13= 18.57** T14= 8.33** T15= 6.08* T23= 8.81**

T24= 1.44 T25= 3.68 T34= 10.25** T35= 12.49** T45= 2.24

Függő változó: Magyar kincs (6)

Csoportosító változó: taptalaj

Csoport Index	Név	Érvényes esetek	átlag	szórás	Minimum	Maximum
1.	MD6	3	0.0000	0.0000	0	0
2.	MD7	3	4.333	2.082	2	6
3.	MD8	3	0.0000	0.0000	0	0
4.	MD9	3	4.000	3.000	1	7
5.	MD10	3	4.667	2.082	3	7

Elméleti szórások egyenlőségének tesztelése

- O'Brien-próba: $F(4; 10) = 1.017$

- Levene-próba: $F(4; 10) = 2.972+$

Elméleti átlagok egyenlőségének tesztelése

Hagyományos eljárás, amely feltételezi a szóráshomogenitást:

- Varianciaanalízis: $F(4; 10) = 4.830^{*}$

Hatásvariancia = 17.0667, Hibavariancia = 3.5333

Korrelációs hányados (nemlineáris korrel. együtttható): $e = 0.812$

Robusztus eljárások, amelyeknél nem szükséges a szóráshomogenitás:

- Welch-próba: $W(4; 5) = \text{Nem értelmezhető}$

- James-próba: $U = \text{Nem értelmezhető}$

- Brown-Forsythe-próba: $BF(4; 5) = 4.830+$

Az átlagok Tukey-Kramer-féle páronkénti összehasonlítása ($k = 5, f = 10$):

T12= 3.99 T13= 0.00 T14= 3.69 T15= 4.30+ T23= 3.99

T24= 0.31 T25= 0.31 T34= 3.69 T35= 4.30+ T45= 0.61

Függő változó: Ezüst Ananaász (7)

Csoportosító változó: taptalaj

Függő változó: Fortuna (8)

Csoportosító változó: taptalaj

Függő változó: Tétényi csereshéj (9)

Csoportosító változó: taptalaj

Csoport Index	Név	Érvényes esetek	átlag	szórás	Minimum	Maximum
1.	MD6	3	0.0000	0.0000	0	0
2.	MD7	3	0.0000	0.0000	0	0
3.	MD8	3	0.0000	0.0000	0	0
4.	MD9	3	2.667	2.517	0	5
5.	MD10	3	0.0000	0.0000	0	0

Elméleti szórások egyenlőségének tesztelése

- O'Brien-próba: $F(4; 10) = 1.238$

- Levene-próba: $F(4; 10) = 4.147^*$

Elméleti átlagok egyenlőségének tesztelése
 Hagyományos eljárás, amely feltételezi a szóráshomogenitást:
 - Varianciaanalízis: $F(4; 10) = 3.368^+$
 Hatásvariancia = 4.2667, Hibavariancia = 1.2667
 Korrelációs hányados (nemlineáris korrel. együtttható): $e = 0.758$

Robusztus eljárások, amelyeknél nem szükséges a szóráshomogenitás:
 - Welch-próba: $W(4; 5) = \text{Nem értelmezhető}$
 - James-próba: $U = \text{Nem értelmezhető}$
 - Brown-Forsythe-próba: $BF(4; 2) = 3.368$

Az átlagok Tukey-Kramer-féle páronkénti összehasonlítása ($k = 5, f = 10$):

T12= 0.00	T13= 0.00	T14= 4.10+	T15= 0.00	T23= 0.00
T24= 4.10+	T25= 0.00	T34= 4.10+	T35= 0.00	T45= 4.10+

Függő változó: HB (10)

Csoportosító változó: táptalaj

Csoport		Érvényes		átlag	szórás	Minimum	Maximum
Index	Név	esetek					
1.	MD6	3	49.33	4.509	45	54	
2.	MD7	3	32.67	3.512	29	36	
3.	MD8	3	0.0000	0.0000	0	0	
4.	MD9	3	18.33	2.517	16	21	
5.	MD10	3	13.67	3.215	10	16	

Elméleti szórások egyenlőségének tesztelése

- O'Brien-próba: $F(4; 10) = 0.662$
- Levene-próba: $F(4; 10) = 1.729$

Elméleti átlagok egyenlőségének tesztelése

- Hagyományos eljárás, amely feltételezi a szóráshomogenitást:
- Varianciaanalízis: $F(4; 10) = 108.287^{**}$
 - Hatásvariancia = 1068.4333, Hibavariancia = 9.8667
 - Korrelációs hányados (nemlineáris korrel. együtttható): $e = 0.989$

Robusztus eljárások, amelyeknél nem szükséges a szóráshomogenitás:

- Welch-próba: $W(4; 4) = \text{Nem értelmezhető}$
- James-próba: $U = \text{Nem értelmezhető}$
- Brown-Forsythe-próba: $BF(4; 7) = 108.287^{**}$

Az átlagok Tukey-Kramer-féle páronkénti összehasonlítása ($k = 5, f = 10$):

T12= 9.19**	T13= 27.20**	T14= 17.09**	T15= 19.67**	T23= 18.01**
T24= 7.90**	T25= 10.48**	T34= 10.11**	T35= 7.54**	T45= 2.57

Mind a Hógolyó, mind a Hale's Best esetén az 1-es táptalaj szignifikánsan jobb eredményeket hozott a többi táptalajnál. A 4-es és 5-ös táptalaj nem különbözött szignifikánsan

9.3.3. Hale's Best sárgadinnye fajta, növényi részek válaszadó képességének vizsgálata, egy magra visszavezetve

Statisztikai rutin: Független minták egyszempontos összehasonlítása

Elemzés sorszáma = 1

Beolvasott esetek száma. 12
Érvényes esetek száma. 12

Jelölés: +: $p < 0.10$ *: $p < 0.05$ **: $p < 0.01$

Függő változó: 2 napos (2)

Csoportosító változó: nov resz

Csoport Index	Név	Érvényes esetek	átlag	szórás	Minimum	Maximum
1.	Sziklev 4	3	0.0000	0.0000	0	0
2.	Sziklev 2	3	0.0000	0.0000	0	0
3.	Dekap.hip	3	0.117	0.0289	0.100	0.150
4.	Hipokotil	3	0.0667	0.0289	0.0500	0.100

Elméleti szórások egyenlőségének tesztelése

- O'Brien-próba: $F(3; 8) = 1.069$
- Levene-próba: $F(3; 8) = 9.619^{**}$

Elméleti átlagok egyenlőségének tesztelése

- Hagyományos eljárás, amely feltételezi a szóráshomogenitást:
- Varianciaanalízis: $F(3; 8) = 23.167^{**}$
- Hatásvariancia = 0.0097, Hibavariancia = 0.0004
- Korrelációs hányados (nemlineáris korrel. együtttható): $e = 0.947$

Robusztus eljárások, amelyeknél nem szükséges a szóráshomogenitás:

- Welch-próba: $W(3; 4) = \text{Nem értelmezhető}$
- James-próba: $U = \text{Nem értelmezhető}$
- Brown-Forsythe-próba: $BF(3; 4) = 23.167^{**}$

Az átlagok Tukey-Kramer-féle páronkénti összehasonlítása ($k = 4, f = 8$):

T12= 0.00 T13= 9.90** T14= 5.66* T23= 9.90** T24= 5.66*
T34= 4.24+

Függő változó: 4 napos (3)

Csoportosító változó: nov resz

Csoport Index	Név	Érvényes esetek	átlag	szórás	Minimum	Maximum
1.	Sziklev 4	3	4.111	0.419	3.667	4.500
2.	Sziklev 2	3	4.133	0.551	3.600	4.700
3.	Dekap.hip	3	0.450	0.100	0.350	0.550
4.	Hipokotil	3	0.333	0.0764	0.250	0.400

Elméleti szórások egyenlőségének tesztelése

- O'Brien-próba: $F(3; 8) = 1.190$
- Levene-próba: $F(3; 8) = 2.304$

Elméleti átlagok egyenlőségének tesztelése

- Hagyományos eljárás, amely feltételezi a szóráshomogenitást:
- Varianciaanalízis: $F(3; 8) = 112.497^{**}$
- Hatásvariancia = 13.9241, Hibavariancia = 0.1238
- Korrelációs hányados (nemlineáris korrel. együtttható): $e = 0.988$

Robusztus eljárások, amelyeknél nem szükséges a szóráshomogenitás:

- Welch-próba: $W(3; 4) = 91.975^{**}$

- James-próba: $U = 367.952^{**}$
 - Brown-Forsythe-próba: $BF(3; 4) = 112.497^{**}$

Az átlagok Tukey-Kramer-féle páronkénti összehasonlítása ($k = 4, f = 8$):
 $T_{12} = 0.11$ $T_{13} = 18.02^{**}$ $T_{14} = 18.60^{**}$ $T_{23} = 18.13^{**}$ $T_{24} = 18.71^{**}$
 $T_{34} = 0.57$

Függő változó: 8 napos (4)

Csoportosító változó: nov resz

Csoport Index	Név	Érvényes esetek	átlag	szórás	Minimum	Maximum
1.	Sziklev 4	3	1.444	0.255	1.167	1.667
2.	Sziklev 2	3	1.267	0.208	1.100	1.500
3.	Dekap.hip	3	0.283	0.0764	0.200	0.350
4.	Hipokotil	3	0.133	0.0577	0.100	0.200

Elméleti szórások egyenlőségének tesztelése

- O'Brien-próba: $F(3; 8) = 1.039$
 - Levene-próba: $F(3; 8) = 2.727$

Elméleti átlagok egyenlőségének tesztelése

Hagyományos eljárás, amely feltételezi a szóráshomogenitást:

- Varianciaanalízis: $F(3; 8) = 45.797^{**}$
 Hatásvariancia = 1.3432, Hibavariancia = 0.0293
 Korrelációs hányados (nemlineáris korrel. együtttható): $e = 0.972$

Robusztus eljárások, amelyeknél nem szükséges a szóráshomogenitás:

- Welch-próba: $W(3; 4) = 37.512^{**}$
 - James-próba: $U = 149.480^{**}$
 - Brown-Forsythe-próba: $BF(3; 4) = 45.797^{**}$

Az átlagok Tukey-Kramer-féle páronkénti összehasonlítása ($k = 4, f = 8$):
 $T_{12} = 1.80$ $T_{13} = 11.74^{**}$ $T_{14} = 13.26^{**}$ $T_{23} = 9.95^{**}$ $T_{24} = 11.46^{**}$
 $T_{34} = 1.52$

Függő változó: 14 napos (5)

Csoportosító változó: nov resz

A 4 napos hajtásoknál van szignifikáns különbség az egyes növényi részek regenerációs képessége között. Az egyes és a kettes csoport (2 darabra vágott sziklelevél és 4 darabra vágott sziklelevél) nem különbözik szignifikánsan egymástól 5%-os szignifikancia szinten a regenerált hajtások számát illetően, viszont a 3-as és 4-es csoport (dekapitált hipokotil és hipokotil sziklelevélhez közeli része) ezektől szignifikánsan rosszabb hatékonyságot mutat.

9.3.4. Hógolyó sárgadinnye fajta növényi részek válaszadó képességének vizsgálata, egy magra visszavezetve

Statisztikai rutin: Független minták egyszempontos összehasonlítása

Elemzés sorszáma = 1

Beolvasott esetek száma. 12
Érvényes esetek száma. 12

Jelölés: +: $p < 0.10$ *: $p < 0.05$ **: $p < 0.01$

Függő változó: 2 napos (2)

Csoportosító változó: nov resz

Csoport Index	Név	Érvényes esetek	átlag	szórás	Minimum	Maximum
1.	Sziklev 4	3	0.0000	0.0000	0	0
2.	Sziklev 2	3	0.0000	0.0000	0	0
3.	Dekap.hip	3	0.0667	0.0289	0.0500	0.100
4.	Hipokotil	3	0.0000	0.0000	0	0

Elméleti szórások egyenlőségének tesztelése

- O'Brien-próba: $F(3; 8) = 1.340$
- Levene-próba: $F(3; 8) = 12.060^{**}$

Elméleti átlagok egyenlőségének tesztelése

- Hagyományos eljárás, amely feltételezi a szóráshomogenitást:
- Varianciaanalízis: $F(3; 8) = 16.000^{**}$
- Hatásvariancia = 0.0033, Hibavariancia = 0.0002
- Korrelációs hányados (nemlineáris korrel. együtttható): $e = 0.926$

Robusztus eljárások, amelyeknél nem szükséges a szóráshomogenitás:

- Welch-próba: $W(3; 4) = \text{Nem értelmezhető}$
- James-próba: $U = \text{Nem értelmezhető}$
- Brown-Forsythe-próba: $BF(3; 2) = 16.000$

Az átlagok Tukey-Kramer-féle páronkénti összehasonlítása ($k = 4, f = 8$):

T12= 0.00 T13= 8.00** T14= 0.00 T23= 8.00** T24= 0.00
T34= 8.00**

Függő változó: 4 napos (3)

Csoportosító változó: nov resz

Csoport Index	Név	Érvényes esetek	átlag	szórás	Minimum	Maximum
1.	Sziklev 4	3	3.944	0.918	3	4.833
2.	Sziklev 2	3	3.567	0.252	3.300	3.800
3.	Dekap.hip	3	0.317	0.0764	0.250	0.400
4.	Hipokotil	3	0.133	0.0764	0.0500	0.200

Elméleti szórások egyenlőségének tesztelése

- O'Brien-próba: $F(3; 8) = 1.672$
- Levene-próba: $F(3; 8) = 3.354^{+}$

Elméleti átlagok egyenlőségének tesztelése

- Hagyományos eljárás, amely feltételezi a szóráshomogenitást:
- Varianciaanalízis: $F(3; 8) = 54.721^{**}$
- Hatásvariancia = 12.5530, Hibavariancia = 0.2294
- Korrelációs hányados (nemlineáris korrel. együtttható): $e = 0.976$

Robusztus eljárások, amelyeknél nem szükséges a szóráshomogenitás:

- Welch-próba: $W(3; 4) = 140.518^{**}$
- James-próba: $U = 559.593^{**}$
- Brown-Forsythe-próba: $BF(3; 2) = 54.721$

Az átlagok Tukey-Kramer-féle páronkénti összehasonlítása ($k = 4, f = 8$):

T12= 1.37 T13= 13.12** T14= 13.78** T23= 11.75** T24= 12.42**
T34= 0.66

Függő változó: 8 napos (4)

Csoportosító változó: nov resz

Csoport		Érvényes esetek	átlag	szórás	Minimum	Maximum
Index	Név					
1.	Sziklev 4	3	1.389	0.585	0.833	2
2.	Sziklev 2	3	1.067	0.208	0.900	1.300
3.	Dekap.hip	3	0.200	0.100	0.100	0.300
4.	Hipokotil	3	0.0000	0.0000	0	0

Elméleti szórások egyenlőségének tesztelése

- O'Brien-próba: $F(3; 8) = 1.438$
- Levene-próba: $F(3; 8) = 3.661+$

Elméleti átlagok egyenlőségének tesztelése

Hagyományos eljárás, amely feltételezi a szóráshomogenitást:

- Varianciaanalízis: $F(3; 8) = 13.576^{**}$
- Hatásvariancia = 1.3438, Hibavariancia = 0.0990
- Korrelációs hányados (nemlineáris korrel. együtttható): $e = 0.914$

Robusztus eljárások, amelyeknél nem szükséges a szóráshomogenitás:

- Welch-próba: $W(3; 4) = \text{Nem értelmezhető}$
- James-próba: $U = \text{Nem értelmezhető}$
- Brown-Forsythe-próba: $BF(3; 3) = 13.576^{*}$

Az átlagok Tukey-Kramer-féle páronkénti összehasonlítása ($k = 4, f = 8$):

T12= 1.77 T13= 6.55** T14= 7.65** T23= 4.77* T24= 5.87*
T34= 1.10

Függő változó: 14 napos (5)

Csoportosító változó: nov resz

A 4 napos hajtásoknál van szignifikáns különbség az egyes növényi részek regenerációs képessége között. Az egyes és a kettes csoport (2 darabra vágott sziklevel és 4 darabra vágott sziklevel) nem különbözik szignifikánsan egymástól 5%-os szignifikancia szinten a regenerált hajtások számát illetően egy magra nézve, viszont a 3-as és 4-es csoport (dekapitált hipokotil, és hipokotil) ezektől szignifikánsan rosszabb hatékonyságot mutat.

9.3.5. Hógolyó növekedésszabályozó anyag optimalizáció

Statisztikai rutin: Kétszemponos független mintás varianciaanalízis

Elemzés sorszáma = 1

Beolvasott esetek száma 60
Érvényes esetek száma 60

Jelölés: +: $p < 0.10$ *: $p < 0.05$ **: $p < 0.01$

1. Csoportosító változó: BA
2. Csoportosító változó: IES

Függő változó: hajtas

Érvényes esetek száma 60

Mintaátlagok táblázata (hajtas)

BA csop.	'IES' szerinti csoportok					átlag
	0	0.3	0.6	0.9	1.2	
0.3	0.375	0.500	1.042	0.583	0.292	0.558
0.6	0.625	0.750	1.167	0.792	0.375	0.742
0.9	0.750	0.875	1.583	1.083	0.833	1.025
1.2	0.333	0.833	0.875	0.708	0.708	0.692
átlag:	0.521	0.740	1.167	0.792	0.552	

Mintaszorások táblázata (hajtas)

BA csop.	'IES' szerinti csoportok				
	0	0.3	0.6	0.9	1.2
0.3	0.125	0.250	0.191	0.144	0.144
0.6	0.217	0.250	0.191	0.191	0.250
0.9	0.331	0.250	0.315	0.315	0.260
1.2	0.144	0.191	0.250	0.361	0.520

Varianciaanalízis összefoglaló táblázata (súlyozatlan átlagok módszere)

Szóródás oka	f	Szórásnégyzet	F
BA	3	0.579	8.52**
IES	4	0.801	11.79**
BA x IES	12	0.060	0.88
Hibatarag	40	0.068	

Robusztus kétszemponos VA (hajtas)

- Welch-próba a BA csoporthatás tesztelésére: $F(3,16) = 8.719^{**}$
- Welch-próba az IES csoporthatás tesztelésére: $F(4,14) = 11.648^{**}$
- Johansen-próba a BA x IES interakció tesztelésére: $J = 14.448$

BA: A szintátlagok Games-Howell-féle páronkénti összehasonlítása

(elméleti szórások különbözhetnek, zárójelben a szabadságfokok):

T12(4,27)= 3.55+ T13(4,23)= 7.42** T14(4,22)= 1.98 T23(4,26)= 4.20*
T24(4,25)= 0.70 T34(4,28)= 4.17*

IES: A szintátlagok Games-Howell-féle páronkénti összehasonlítása

(elméleti szórások különbözhetnek, zárójelben a szabadságfokok):

T12(5,22)= 3.32 T13(5,22)= 9.68** T14(5,21)= 3.83+ T15(5,19)= 0.39
T23(5,22)= 6.18** T24(5,22)= 0.71 T25(5,20)= 2.29 T34(5,22)= 5.09*
T35(5,20)= 7.43** T45(5,21)= 2.79

A Variancia analízisből látható, hogy mind a BA, mind az IES szignifikánsan befolyásolja a kifejlődött növények számát, a 1%-os szignifikancia szinten is. A páronkénti összehasonlításból látható, hogy a BA esetén a 3-as csoport (BA=0.9 mg/l) szignifikánsan különbözik a többi csoporttól. Az IES csoportok közül a 3-as csoport (IES=0.6 mg/l) mutat szignifikáns eltérést a többi csoporttól.

9.3.6. Hale's best növekedésszabályozó anyag optimalizáció

Statistikai rutin: Kétszemponos független mintás varianciaanalízis

Elemzés sorszáma = 1

Beolvasott esetek száma 60
Érvényes esetek száma 60

Jelölés: +: $p < 0.10$ *: $p < 0.05$ **: $p < 0.01$

1. Csoportosító változó: BA
2. Csoportosító változó: IES

Függő változó: hajtas

Érvényes esetek száma 60

Mintaátlagok táblázata (hajtas)

BA csop.	'IES' szerinti csoportok					átlag
	0	0.3	0.6	0.9	1.2	
0.3	0.250	0.500	0.667	0.833	0.500	0.550
0.6	0.500	0.917	1.333	2.000	1.083	1.167
0.9	0.417	0.750	1.083	1.583	0.750	0.917
1.2	0.417	0.667	0.917	1.333	0.667	0.800
átlag:	0.396	0.708	1.000	1.438	0.750	

Mintaszórások táblázata (hajtas)

BA csop.	'IES' szerinti csoportok				
	0	0.3	0.6	0.9	1.2
0.3	0.217	0.125	0.361	0.191	0.250
0.6	0.250	0.260	0.315	0.217	0.191
0.9	0.315	0.217	0.191	0.144	0.217
1.2	0.289	0.191	0.315	0.439	0.191

Varianciaanalízis összefoglaló táblázata (súlyozatlan átlagok módszere)

Szóródás oka	f	Szórásnégyzet	F
BA	3	0.985	15.13**
IES	4	1.811	27.82**
BA x IES	12	0.067	1.03
Hibata	40	0.065	

Robusztus kétszemponos VA (hajtas)

- Welch-próba a BA csoporthatás tesztelésére: $F(3,17) = 15.085^{**}$
- Welch-próba az IES csoporthatás tesztelésére: $F(4,16) = 22.237^{**}$
- Johansen-próba a BA x IES interakció tesztelésére: $J = 39.981^{+}$

BA: A szintátlagok Games-Howell-féle páronkénti összehasonlítása

(elméleti szórások különbözhetnek, zárójelben a szabadságfokok):

T12(4,28)= 9.72** T13(4,28)= 6.10** T14(4,27)= 3.56+ T23(4,28)= 4.08*
T24(4,27)= 5.15** T34(4,26)= 1.71

IES: A szintátlagok Games-Howell-féle páronkénti összehasonlítása

(elméleti szórások különbözhetnek, zárójelben a szabadságfokok):

T12(5,20)= 4.52* T13(5,22)= 7.31** T14(5,22)= 13.30** T15(5,21)= 5.04*
T23(5,19)= 3.92+ T24(5,20)= 10.49** T25(5,22)= 0.69 T34(5,22)= 5.27**
T35(5,20)= 3.31 T45(5,21)= 9.73**

A Variancia analízisből látható, hogy mind a BA, mind az IES szignifikánsan befolyásolja a kifejlődött növények számát, a 1%-os szignifikancia szinten is. A BA esetében a 2-es csoport (BA=0.6 mg/l), IES esetében pedig a 4-es csoport (IES=0.9 mg/l) mutat szignifikáns eltérést a többi csoporttól. A BA esetében az 1-es csoport is szignifikáns eltérést mutat (BA=0 mg/l).

9.3.7. A patiszon növekedésszabályozó anyag optimalizációs kísérletének értékelése

Függő változó: patiszon

Érvényes esetek száma 75

Mintaátlagok táblázata (patiszon)

BA csop.	'IES' szerinti csoportok					átlag
	0	0.1	0.3	0.6	0.9	
0	0.667	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.133
0.6	0.667	0.0000	0.667	0.333	0.667	0.467
0.8	1.000	1.000	0.0000	0.0000	0.0000	0.400
1	0.667	0.0000	0.333	0.333	0.333	0.333
1.2	0.0000	0.667	0.333	0.333	0.0000	0.267
átlag:	0.600	0.333	0.267	0.200	0.200	

Mintaszórások táblázata (patiszon)

BA csop.	'IES' szerinti csoportok				
	0	0.1	0.3	0.6	0.9
0	0.577	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
0.6	0.577	0.0000	0.577	0.577	1.155
0.8	1.000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
1	0.577	0.0000	0.577	0.577	0.577
1.2	0.0000	0.577	0.577	0.577	0.0000

Varianciaanalízis összefoglaló táblázata (súlyozatlan átlagok módszere)

Szóródás oka	f	Szórásnégyzet	F
BA	4	0.247	1.03
IES	4	0.413	1.72
BA x IES	16	0.355	1.48
Hibatag	50	0.240	

Robusztus kétszemponos VA (patiszon)

- Welch-próba a BA csoportthatás tesztelésére: $F(4,9) = 1.369$
- Welch-próba az IES csoportthatás tesztelésére: $F(4,10) = 1.019$
- Johansen-próba a BA x IES interakció tesztelésére: $J = \text{Nem értelmes}$

9.3.8. A cukkini növekedésszabályozó anyag optimalizációs kísérletének értékelése

Statisztikai rutin: Kétszemponos független mintás varianciaanalízis

Elemzés sorszáma = 1

Beolvasott esetek száma 75
Érvényes esetek száma 75

Jelölés: +: $p < 0.10$ *: $p < 0.05$ **: $p < 0.01$

1. Csoportosító változó: BA
2. Csoportosító változó: IES

Mintaelemszámok táblázata

BA csop.	'IES' szerinti csoportok					Össz.
	0	0.1	0.3	0.6	0.9	
0	3	3	3	3	3	15
0.6	3	3	3	3	3	15
0.8	3	3	3	3	3	15
1	3	3	3	3	3	15
1.2	3	3	3	3	3	15
Össz.	15	15	15	15	15	75

Függő változó: hajtas

Érvényes esetek száma 75

Mintaátlagok táblázata (hajtas)

BA csop.	'IES' szerinti csoportok					átlag
	0	0.1	0.3	0.6	0.9	
0	0.222	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0444
0.6	0.222	0.0000	0.222	0.111	0.222	0.156
0.8	0.333	0.333	0.0000	0.0000	0.0000	0.133
1	0.222	0.0000	0.111	0.111	0.111	0.111
1.2	0.0000	0.222	0.111	0.222	0.0000	0.111
átlag:	0.200	0.111	0.0889	0.0889	0.0667	

Mintaszórások táblázata (hajtas)

BA csop.	'IES' szerinti csoportok				
	0	0.1	0.3	0.6	0.9
0	0.192	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
0.6	0.192	0.0000	0.192	0.192	0.385
0.8	0.333	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
1	0.192	0.0000	0.192	0.192	0.192
1.2	0.0000	0.192	0.192	0.192	0.0000

Varianciaanalízis összefoglaló táblázata (súlyozatlan átlagok módszere)

Szóródás oka	f	Szórásnégyzet	F
BA	4	0.026	0.97
IES	4	0.041	1.53
BA x IES	16	0.044	1.63+
Hibatag	50	0.027	

Robusztus kétszemponos VA (hajtas)

- Welch-próba a BA csoportthatás tesztelésére: $F(4,9) = 1.470$
- Welch-próba az IES csoportthatás tesztelésére: $F(4,10) = 0.848$
- Johansen-próba a BA x IES interakció tesztelésére: $J = \text{Nem értelmes}$

9.3.9. A sütőtök növekedésszabályozó anyag optimalizációs kísérletének értékelése

Statisztikai rutin: Kétszemponos független mintás varianciaanalízis

Elemzés sorszáma = 1

Beolvasott esetek száma 75
Érvényes esetek száma 75

Jelölés: +: $p < 0.10$ *: $p < 0.05$ **: $p < 0.01$

1. Csoportosító változó: BA
2. Csoportosító változó: IES

Mintaelemszámok táblázata

BA csop.	'IES' szerinti csoportok					Össz.
	0	0.1	0.3	0.6	0.9	
0	3	3	3	3	3	15
0.6	3	3	3	3	3	15
0.8	3	3	3	3	3	15
1	3	3	3	3	3	15
1.2	3	3	3	3	3	15
Össz.	15	15	15	15	15	75

Függő változó: hajtas

Érvényes esetek száma 75

Mintaátlagok táblázata (hajtas)

BA csop.	'IES' szerinti csoportok					átlag
	0	0.1	0.3	0.6	0.9	
0	0.0000	0.111	0.0000	0.111	0.111	0.0667
0.6	0.333	0.111	0.222	0.333	0.111	0.222
0.8	0.333	0.333	0.222	0.444	0.222	0.311
1	0.222	0.556	0.333	0.333	0.444	0.378
1.2	0.222	0.222	0.333	0.111	0.222	0.222
átlag:	0.222	0.267	0.222	0.267	0.222	

Mintaszórások táblázata (hajtas)

BA csop.	'IES' szerinti csoportok				
	0	0.1	0.3	0.6	0.9
0	0.0000	0.192	0.0000	0.192	0.192
0.6	0.0000	0.192	0.192	0.0000	0.192
0.8	0.333	0.333	0.192	0.192	0.192
1	0.192	0.192	0.0000	0.333	0.509
1.2	0.192	0.192	0.333	0.192	0.192

Varianciaanalízis összefoglaló táblázata (súlyozatlan átlagok módszere)

Szóródás oka	f	Szórásnégyzet	F
BA	4	0.205	4.07**
IES	4	0.009	0.18
BA x IES	16	0.033	0.65
Hibata	50	0.050	

Robusztus kétszemponos VA (hajtas)

- Welch-próba a BA csoportthatás tesztelésére: $F(4,15) = 4.531^*$
- Welch-próba az IES csoportthatás tesztelésére: $F(4,13) = 0.165$
- Johansen-próba a BA x IES interakció tesztelésére: $J = \text{Nem értelmes}$

BA: A szintátlagok Games-Howell-féle páronkénti összehasonlítása
(elméleti szórások különbözhetnek, zárójelben a szabadságfokok):

T12(5,28)= 4.04+ T13(5,22)= 4.49* T14(5,21)= 5.11* T15(5,24)= 3.13
T23(5,22)= 1.63 T24(5,21)= 2.56 T25(5,24)= 0.00 T34(5,27)= 0.93
T35(5,28)= 1.41 T45(5,26)= 2.27

9.3.10. Agar és phytigel bázisú táptalajok összehasonlítása regeneráció esetén

Hógolyó regeneráció agar ill. phytigel összehasonlítása gyökeres regeneránsok felneveléséhez szükséges időtartam alapján

Statistikai rutin: Független minták egyszempontos összehasonlítása

Elemzés sorszáma = 1

Beolvasott esetek száma. 10
Érvényes esetek száma. 10

Jelölés: +: $p < 0.10$ *: $p < 0.05$ **: $p < 0.01$

Függő változó: napok száma (2)

Csoportosító változó: táptalaj

Csoport Index	Név	Érvényes esetek	átlag	szórás	Minimum	Maximum
1.	Agar	5	89.80	1.789	88	92
2.	Phytigel	5	77.80	3.899	71	81

Elméleti szórások egyenlőségének tesztelése

- O'Brien-próba: $F(1; 8) = 0.889$
- Levene-próba: $F(1; 8) = 1.249$

Elméleti átlagok egyenlőségének tesztelése

Hagyományos eljárás, amely feltételezi a szóráshomogenitást:

- Kétmintás t-próba: $t(8) = 6.255^{**}$

Robusztus eljárás, amelynél nem szükséges a szóráshomogenitás:

- Welch-féle d-próba: $d(6) = 6.255^{**}$

95%-os konfidencia-intervallum a két elméleti átlag m1-m2 különbségére

- a kétmintás t-próba alapján: $C(0.95) = (7.58, 16.42)$
- a Welch-féle d-próba alapján: $C(0.95) = (7.30, 16.70)$

A két mintás t-próba és a Welch-féle próba is szignifikánsan eltérőnek mutatja az agar és a phytigel táptalajt.

Hógolyó regeneráció agar phytigel összehasonlítás gyökeres regeneránsok száma alapján

Statistikai rutin: Független minták egyszempontos összehasonlítása

Elemzés sorszáma = 1

Beolvasott esetek száma. 12
Érvényes esetek száma. 12

Jelölés: +: $p < 0.10$ *: $p < 0.05$ **: $p < 0.01$

Függő változó: gyökeres regeneráció (2)

Csoportosító változó: táptalaj

Csoport	Érvényes
---------	----------

Index	Név	esetek	átlag	szórás	Minimum	Maximum
1.	Agar	6	53.67	7.763	42	62
2.	Phytigel	6	41.67	11.67	29	56

Elméleti szórások egyenlőségének tesztelése

- O'Brien-próba: $F(1; 10) = 2.505$
- Levene-próba: $F(1; 10) = 2.861$

Elméleti átlagok egyenlőségének tesztelése

- Hagyományos eljárás, amely feltételezi a szóráshomogenitást:
- Kétmintás t-próba: $t(10) = 2.097+$

Robusztus eljárás, amelynél nem szükséges a szóráshomogenitás:

- Welch-féle d-próba: $d(9) = 2.097+$

95%-os konfidencia-intervallum a két elméleti átlag $m_1 - m_2$ különbségére

- a kétmintás t-próba alapján: $C(0.95) = (-0.75, 24.75)$
- a Welch-féle d-próba alapján: $C(0.95) = (-0.95, 24.95)$

A kétféle táptalaj (agar, phytigel) nem mutat eltérést 5%-os szignifikancia szinten a gyökeres regeneránsok számát tekintve a Hógolyó regenerációs kísérletben.

9.3.11. A friss és tárolt magokkal végzett kísérlet értékelése

```
1. elemzés
Statisztikai rutin: Független minták egyszempontos összehasonlítása
-----

Elemzés sorszáma = 1
-----

Beolvasott esetek száma. . . . . 25
Érvényes esetek száma. . . . . 24

Jelölés:  +: p < 0.10   *: p < 0.05   **: p < 0.01

Függő változó: novdb (3)
-----
Csoportosító változó: eredet

      Csoport      Érvényes
      Index  Név      esetek      átlag      szórás      Minimum      Maximum
-----
      1.   régi      12      16.08      7.128      5          25
      2.    új      12      22.50     19.14      5          63
-----

Elméleti szórások egyenlőségének tesztelése
- O'Brien-próba: F(1; 22) = 4.512*
- Levene-próba: F(1; 22) = 11.055**

Elméleti átlagok egyenlőségének tesztelése
Hagyományos eljárás, amely feltételezi a szóráshomogenitást:
- Kétmintás t-próba: t(22) = -1.088

Robusztus eljárás, amelynél nem szükséges a szóráshomogenitás:
- Welch-féle d-próba: d(14) = -1.088

95%-os konfidencia-intervallum a két elméleti átlag m1-m2 különbségére
- a kétmintás t-próba alapján: C(0.95) = (-18.64, 5.81)
- a Welch-féle d-próba alapján: C(0.95) = (-19.06, 6.23)

2. elemzés

Elemzés sorszáma = 2
-----

Beolvasott esetek száma. . . . . 25
Érvényes esetek száma. . . . . 24

Jelölés:  +: p < 0.10   *: p < 0.05   **: p < 0.01

Függő változó: novdb (3)
-----
Csoportosító változó: agar

      Csoport      Érvényes
      Index  Név      esetek      átlag      szórás      Minimum      Maximum
-----
      1.   0,5      8      6.750      1.488      5          9
      2.    1      8     18.50      4.690     12         25
      3.    2      8     32.63     16.83     17         63
-----

Elméleti szórások egyenlőségének tesztelése
- O'Brien-próba: F(2; 21) = 4.584*
- Levene-próba: F(2; 21) = 13.290**

Elméleti átlagok egyenlőségének tesztelése
Hagyományos eljárás, amely feltételezi a szóráshomogenitást:
- Varianciaanalízis: F(2; 21) = 13.107**
  Hatásvariancia = 1342.7917, Hibavariancia = 102.4464
  Korrelációs hányados (nemlineáris korrel. együtttható): e = 0.745

Robusztus eljárások, amelyeknél nem szükséges a szóráshomogenitás:
- Welch-próba: W(2; 10) = 29.514**
- James-próba: U = 62.870**
```

- Brown-Forsythe-próba: $BF(2; 8) = 13.107^{**}$

Átlagok Games-Howell-féle páronkénti összehasonlítása
(elméleti szórások különbözhetnek, zárójelben a szabadságfokok):
 $T12(3; 8) = 9.55^{**}$ $T13(3; 7) = 6.13^{**}$ $T23(3; 8) = 3.23$

3. elemzés

Elemzés sorszáma = 3

Feltételes csoportok definíciója

csop./eredet	Kód	Név
1.	0	régi
2.	1	új

Csoportindex: 1. Csoportnév: régi

Beolvasott esetek száma 25
Feltételes csoport elemszáma 12
Érvényes esetek száma 12

Jelölés: +: $p < 0.10$ *: $p < 0.05$ **: $p < 0.01$

Függő változó: novdb (3)

Csoportosító változó: agar

Csoport Index	Név	Érvényes esetek	átlag	szórás	Minimum	Maximum
1.	0,5	4	7.000	1.826	5	9
2.	1	4	22.25	2.500	19	25
3.	2	4	19.00	2.160	17	22

Elméleti szórások egyenlőségének tesztelése

- O'Brien-próba: $F(2; 9) = 0.199$
- Levene-próba: $F(2; 9) = 0.060$

Elméleti átlagok egyenlőségének tesztelése

Hagyományos eljárás, amely feltételezi a szóráshomogenitást:
- Varianciaanalízis: $F(2; 9) = 54.333^{**}$
Hatásvariancia = 258.0833, Hibavariancia = 4.7500
Korrelációs hányados (nemlineáris korrel. együtttható): $e = 0.961$

Robusztus eljárások, amelyeknél nem szükséges a szóráshomogenitás:
- Welch-próba: $W(2; 6) = 55.387^{**}$
- James-próba: $U = 123.285^{**}$
- Brown-Forsythe-próba: $BF(2; 8) = 54.333^{**}$

Átlagok Tukey-Kramer-féle páronkénti összehasonlítása ($k = 3, f = 9$):
 $T12 = 13.99^{**}$ $T13 = 11.01^{**}$ $T23 = 2.98$

4. elemzés

Csoportindex: 2. Csoportnév: új

Beolvasott esetek száma 25
Feltételes csoport elemszáma 12
Érvényes esetek száma 12

Jelölés: +: $p < 0.10$ *: $p < 0.05$ **: $p < 0.01$

Függő változó: novdb (3)

Csoportosító változó: agar

Csoport Index	Név	Érvényes esetek	átlag	szórás	Minimum	Maximum
------------------	-----	--------------------	-------	--------	---------	---------

1.	0,5	4	6.500	1.291	5	8
2.	1	4	14.75	2.754	12	18
3.	2	4	46.25	12.69	35	63

Elméleti szórások egyenlőségének tesztelése

- O'Brien-próba: $F(2; 9) = 2.563$
- Levene-próba: $F(2; 9) = 7.606^*$

Elméleti átlagok egyenlőségének tesztelése

- Hagyományos eljárás, amely feltételezi a szóráshomogenitást:
- Varianciaanalízis: $F(2; 9) = 31.033^{**}$
- Hatásvariancia = 1760.2500, Hibavariancia = 56.7222
- Korrelációs hányados (nemlineáris korrel. együtttható): $e = 0.935$

Robusztus eljárások, amelyeknél nem szükséges a szóráshomogenitás:

- Welch-próba: $W(2; 5) = 28.710^{**}$
- James-próba: $U = 65.520^{**}$
- Brown-Forsythe-próba: $BF(2; 3) = 31.033^{**}$

Átlagok Tukey-Kramer-féle páronkénti összehasonlítása ($k = 3, f = 9$):

T12= 2.19 T13= 10.56** T23= 8.36**

5. elemzés

Statisztikai rutin: Kétszemponthoz független mintás varianciaanalízis

Elemzés sorszáma = 1

Beolvasott esetek száma 25
Érvényes esetek száma 24

Jelölés: +: $p < 0.10$ *: $p < 0.05$ **: $p < 0.01$

1. Csoportosító változó: eredet
2. Csoportosító változó: agar

Mintaelemszámok táblázata

eredet	'agar' szerinti csoportok			Össz.
csop.	0,5	1	2	
				+
régi	4	4	4	12
új	4	4	4	12
				+
Össz.	8	8	8	24

Függő változó: novdb

Érvényes esetek száma 24

Mintaátlagok táblázata (novdb)

eredet	'agar' szerinti csoportok			átlag
csop.	0,5	1	2	
				+
régi	7.000	22.25	19.00	16.08
új	6.500	14.75	46.25	22.50
				+
átlag:	6.750	18.50	32.63	

Mintaszórások táblázata (novdb)

eredet	'agar' szerinti csoportok		
csop.	0,5	1	2
régi	1.826	2.500	2.160
új	1.291	2.754	12.69

Varianciaanalízis összefoglaló táblázata (súlyozatlan átlagok módszere)

Szóródás oka	f	Szórásnégyzet	F
eredet	1	247.042	8.04*
agar	2	1342.792	43.69**
eredet x agar	2	675.542	21.98**

Robusztus kétszemponos VA (novdb)

- Welch-próba az eredet csoportthatás tesztelésére: $F(1,4) = 8.038^*$
- Welch-próba az agar csoportthatás tesztelésére: $F(2,7) = 75.420^{**}$
- Johansen-próba az eredet x agar interakció tesztelésére: $J = 63.859^{**}$

agar: A szintátlagok Games-Howell-féle páronkénti összehasonlítása
(elméleti szórások különbözhetnek, zárójelben a szabadságfokok):
 $T12(3,11) = 15.32^{**}$ $T13(3,7) = 11.21^{**}$ $T23(3,8) = 5.97^{**}$

9.3.12. A Muskotály fajtával végzett táptalaj kísérlet értékelése (MD11-16)

Statisztikai rutin: Független minták egyszempontos összehasonlítása

Elemzés sorszáma = 1

Beolvasott esetek száma. 36
Érvényes esetek száma. 36

Jelölés: +: $p < 0.10$ *: $p < 0.05$ **: $p < 0.01$

Függő változó: novdb (2)

Csoportosító változó: eredet

Csoport Index	Név	Érvényes esetek	átlag	szórás	Minimum	Maximum
1.	MD11	5	11.00	8.155	5	25
2.	MD12	5	13.80	3.962	8	19
3.	MD13	14	61.71	22.71	31	98
4.	MD14	4	3.250	1.258	2	5
5.	MD15	4	3.500	1.291	2	5
6.	MD16	4	9.500	3.697	5	14

Elméleti szórások egyenlőségének tesztelése

- O'Brien-próba (Welch-féle): $F(5; 11) = 3.780^*$
- Levene-próba (Welch-féle): $F(5; 11) = 8.200^{**}$

Elméleti átlagok egyenlőségének tesztelése

Hagyományos eljárás, amely feltételezi a szóráshomogenitást:

- Varianciaanalízis: $F(5; 30) = 20.781^{**}$
- Hatásvariancia = 4906.0686, Hibavariancia = 236.0802
- Korrelációs hányados (nemlineáris korrel. együtttható): $e = 0.881$

Robusztus eljárások, amelyeknél nem szükséges a szóráshomogenitás:

- Welch-próba: $W(5; 11) = 21.458^{**}$
- James-próba: $U = 133.122^{**}$
- Brown-Forsythe-próba: $BF(5; 19) = 61.186^{**}$

Átlagok Games-Howell-féle páronkénti összehasonlítása

(elméleti szórások különbözhetnek, zárójelben a szabadságfokok):

T12(6; 6) = 0.98 T13(6; 17) = 10.13** T14(6; 4) = 2.96 T15(6; 4) = 2.86
T16(6; 6) = 0.52 T23(6; 15) = 10.72** T24(6; 5) = 7.93* T25(6; 5) = 7.72*
T26(6; 7) = 2.37 T34(6; 13) = 13.55** T35(6; 13) = 13.49** T36(6; 15) = 11.64**
T45(6; 6) = 0.39 T46(6; 4) = 4.53 T56(6; 4) = 4.33

9.3.13. A Hógolyó fajtaival végzett táptalaj kísérlet értékelése (MD11-16)

Statistikai rutin: Független minták egyszempontos összehasonlítása

Elemzés sorszáma = 1

Beolvasott esetek száma. 33
Érvényes esetek száma. 33

Jelölés: +: $p < 0.10$ *: $p < 0.05$ **: $p < 0.01$

Függő változó: novdb (2)

Csoportosító változó: eredet

Csoport Index	Név	Érvényes esetek	átlag	szórás	Minimum	Maximum
1.	MD11	6	10.83	2.229	8	14
2.	MD12	6	16.83	5.382	11	24
3.	MD13	9	35.67	9.233	21	50
4.	MD14	4	4.500	2.646	2	8
5.	MD15	4	2.750	0.957	2	4
6.	MD16	4	10.75	3.594	8	16

Elméleti szórások egyenlőségének tesztelése

- O'Brien-próba (Welch-féle): $F(5; 10) = 3.249+$
- Levene-próba (Welch-féle): $F(5; 11) = 6.033^{**}$

Elméleti átlagok egyenlőségének tesztelése

Hagyományos eljárás, amely feltételezi a szóráshomogenitást:

- Varianciaanalízis: $F(5; 27) = 29.285^{**}$
- Hatásvariancia = 991.5424, Hibavariancia = 33.8580
- Korrelációs hányados (nemlineáris korrel. együtttható): $e = 0.919$

Robusztus eljárások, amelyeknél nem szükséges a szóráshomogenitás:

- Welch-próba: $W(5; 11) = 31.984^{**}$
- James-próba: $U = 198.991^{**}$
- Brown-Forsythe-próba: $BF(5; 18) = 45.874^{**}$

Átlagok Tukey-Kramer-féle páronkénti összehasonlítása ($k = 6$, $f = 27$):

T12= 2.53 T13= 11.45** T14= 2.38 T15= 3.04 T16= 0.03
T23= 8.68** T24= 4.64* T25= 5.30* T26= 2.29 T34= 12.61**
T35= 13.31** T36= 10.08** T45= 0.60 T46= 2.15 T56= 2.75

A 3-as táptalaj (MD13) 1%-os szignifikancia szinten különbözött az összes többi táptalajtól a Tukey-Kramer-féle páronkénti összehasonlítás szerint.

9.3.14. Az Ezüstananász fajtával végzett táptalaj kísérlet értékelése (MD11 és MD13)

```
Statisztikai rutin: Független minták egyszempontos összehasonlítása
-----

Elemzés sorszáma = 1
-----

Beolvasott esetek száma. . . . . 8
Érvényes esetek száma. . . . . 8

Jelölés:  +: p < 0.10    *: p < 0.05    **: p < 0.01

Függő változó: novdb (2)
-----
Csoportosító változó: Eredet

      Csoport      Érvényes
      Index  Név      esetek      átlag      szórás      Minimum      Maximum
-----
1.   MD11          4      15.25      4.787      10          21
2.   MD13          4      36.00      5.944      28          41
-----

Elméleti szórások egyenlőségének tesztelése
- O'Brien-próba: F(1; 6) = 0.232
- Levene-próba: F(1; 6) = 0.180

Elméleti átlagok egyenlőségének tesztelése
Hagyományos eljárás, amely feltételezi a szóráshomogenitást:
- Kétmintás t-próba: t(6) = -5.438**

Robusztus eljárás, amelynél nem szükséges a szóráshomogenitás:
- Welch-féle d-próba: d(6) = -5.438**

95%-os konfidencia-intervallum a két elméleti átlag m1-m2 különbségére
- a kétmintás t-próba alapján: C(0.95) = (-30.09, -11.41)
- a Welch-féle d-próba alapján: C(0.95) = (-30.09, -11.41)
```

A két táptalajon kapott eredmény (MD11 és MD13) 1%-os szignifikancia szinten különbözik egymástól kétmintás-t próba és a Welch-féle próba alapján.

9.3.15. Agar és phytigel tartalmú táptalajok összehasonlítása transzformáció esetén

Hógolyó transzformáció agar ill. phytigel összehasonlítása gyökeres regeneránsok felneveléséhez szükséges időtartam alapján

Statisztikai rutin: Független minták egyszempontos összehasonlítása

Elemzés sorszáma = 1

Beolvasott esetek száma. 10
Érvényes esetek száma. 10

Jelölés: +: $p < 0.10$ *: $p < 0.05$ **: $p < 0.01$

Függő változó: napok sz (2)

Csoportosító változó: táptalaj

Csoport Index	Név	Érvényes esetek	átlag	szórás	Minimum	Maximum
1.	Agar	5	118.60	3.507	115	124
2.	Phytigel	5	107.60	1.673	105	109

Elméleti szórások egyenlőségének tesztelése

- O'Brien-próba: $F(1; 8) = 1.464$
- Levene-próba: $F(1; 8) = 2.726$

Elméleti átlagok egyenlőségének tesztelése

- Hagyományos eljárás, amely feltételezi a szóráshomogenitást:
- Kétmintás t-próba: $t(8) = 6.330^{**}$

Robusztus eljárás, amelynél nem szükséges a szóráshomogenitás:

- Welch-féle d-próba: $d(6) = 6.330^{**}$

95%-os konfidencia-intervallum a két elméleti átlag m1-m2 különbségére

- a kétmintás t-próba alapján: $C(0.95) = (6.99, 15.01)$
- a Welch-féle d-próba alapján: $C(0.95) = (6.75, 15.25)$

A kétmintás t-próba és a Welch-féle próba is szignifikánsan eltérőnek mutatja az agar és a phytigel táptalajt a növények felneveléséhez szükséges időtartam szerint.

Hógolyó transzformáció agar ill. phytigel összehasonlítása gyökeres regeneránsok száma alapján

Statisztikai rutin: Független minták egyszempontos összehasonlítása

Elemzés sorszáma = 1

Beolvasott esetek száma. 12
Érvényes esetek száma. 12

Jelölés: +: $p < 0.10$ *: $p < 0.05$ **: $p < 0.01$

Függő változó: gyok reg (2)

Csoportosító változó: taptalaj

Csoport Index	Név	Érvényes esetek	átlag	szórás	Minimum	Maximum
------------------	-----	--------------------	-------	--------	---------	---------

1.	Agar	6	5.167	1.722	3	7
2.	Phytigel	6	7.167	1.472	5	9

Elméleti szórások egyenlőségének tesztelése

- O'Brien-próba: $F(1; 10) = 0.367$
- Levene-próba: $F(1; 10) = 0.833$

Elméleti átlagok egyenlőségének tesztelése

Hagyományos eljárás, amely feltételezi a szóráshomogenitást:

- Kétmintás t-próba: $t(10) = -2.162+$

Robusztus eljárás, amelynél nem szükséges a szóráshomogenitás:

- Welch-féle d-próba: $d(10) = -2.162+$

95%-os konfidencia-intervallum a két elméleti átlag m1-m2 különbségére

- a kétmintás t-próba alapján: $C(0.95) = (-4.060, 0.060)$
- a Welch-féle d-próba alapján: $C(0.95) = (-4.060, 0.060)$

A kétféle táptalaj (agar, phytigel) nem mutat eltérést 5%-os szignifikancia szinten a gyökeres regeneránsok számát tekintve a Hógolyó transzformációs kísérletben a kétmintás-t próba és a Welch-féle próba alapján.

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Velich Istvánnak és Dr. Bisztray György Dénesnek, akik a Budapesti Corvinus Egyetem Genetika és Növénynevelés Tanszéken irányították a munkámat. Pánczél Saroltának és Simonyi Katalinnak, akikkel együtt dolgoztam a sárgadinnye és tök regenerációs valamint transzformációs kísérleteken.

Hálás vagyok továbbá Dr. Pedryc Andrzej tanszékvezetői támogatásáért, valamint a Genetika és Növénynevelés Tanszék minden volt és jelenlegi munkatársának sok segítségével, különösképpen Gyurcsáné Millei Ágnesnek, aki a laboratóriumi munkákban nélkülözhetetlenül sokat segített és számos gyakorlati tanáccsal látott el.

Köszönet illeti jelenlegi tanszékvezetőmet, Dr. Lukács Noémit, amiért lehetővé tette számomra, hogy doktori munkámat befejezhessem és bekapcsolódhassak a Növényélettan és Növényi Biokémia Tanszék oktatási és kutatási munkáiba. Emellett hálával tartozom a tanszék volt, illetve jelenlegi munkatársainak, akik munkájukkal és ötleteikkel sokszor és sokat segítettek.

Külön köszönetemet fejezem ki Dr. Ferenczy Antalnak és Kiss Olivérnek, akik a statisztikai adatok kiértékelésében nyújtottak segítséget.

Dolgozatomat a családomnak ajánlom, mellyel szeretném kifejezni hálámat az általuk nyújtott szeretetért, támogatásért és ösztönzésért, amely nélkül nem jöhetett volna létre a dolgozat.